



Caractérisations biochimique et biologique des lipopolysaccharides des bactéries présentes dans les bains de dialyse. Pseudomonas cepacia et pseudomonas testosteroni. Etude de leur transfert à travers la membrane de dialyse

Laurent Simard

► **To cite this version:**

Laurent Simard. Caractérisations biochimique et biologique des lipopolysaccharides des bactéries présentes dans les bains de dialyse. Pseudomonas cepacia et pseudomonas testosteroni. Etude de leur transfert à travers la membrane de dialyse. Biotechnologies. Université Claude Bernard - Lyon I, 1989. Français. NNT: . tel-01070676

HAL Id: tel-01070676

<https://theses.hal.science/tel-01070676>

Submitted on 2 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre:

Année 1989

THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD-LYON I

pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT

par
Laurent SIMARD

**CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES
LIPOPOLYSACCHARIDES DES BACTÉRIES PRÉSENTES
DANS LES BAINS DE DIALYSE :**
Pseudomonas cepacia et Pseudomonas testosteroni.

**ÉTUDE DE LEUR TRANSFERT
A TRAVERS LA MEMBRANE DE DIALYSE.**

Soutenue le 19 décembre 1989

JURY

Monsieur Jean Villard

Madame Maud Bruneteau

Monsieur Hubert Mayer

Madame Marie-José Transy

Monsieur Canh Tran-Minh

N° d'ordre:

Année 1989

THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD-LYON I

pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT

par
Laurent SIMARD

CARACTÉRISATIONS BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES
LIPOPOLYSACCHARIDES DES BACTÉRIES PRÉSENTES
DANS LES BAINS DE DIALYSE :
Pseudomonas cepacia et *Pseudomonas testosteroni*.

ÉTUDE DE LEUR TRANSFERT
A TRAVERS LA MEMBRANE DE DIALYSE.

Soutenue le 19 décembre 1989

JURY

Monsieur Jean Villard

Madame Maud Bruneteau

Monsieur Hubert Mayer

Madame Marie-José Transy

Monsieur Canh Tran-Minh

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université
1er Vice-Président Fédération Santé
Coordonnateur Fédération Sciences
Président du Comité de Coordination
Des études Médicales
Secrétaire Général

M. le Pr. P. ZECH
M. le Pr. L.M. PATRICOT
M. le Pr. R. UZAN

M. le Pr. P. ZECH
M. F. MARIANI

FEDERATION SANTE

UFR de Médecine GRANGE BLANCHE
UFR de Médecine ALEXIS-CARREL
UFR de Médecine LYON-NORD
UFR de Médecine LYON-SUD
UFR de PHARMACIE
UFR d' ODONTOLOGIE
INSTITUT de TECHNIQUES DE READAPTATION

DIRECTEUR : Mme le Pr. H. PELLET
DIRECTEUR : M. le Pr J.C. EVREUX
DIRECTEUR : M. le Pr. L.M. PATRICOT
DIRECTEUR : M. le Pr. H. DEJOURS
DIRECTEUR : M. le Pr. J. VILLARD
DIRECTEUR : M. le Pr. H. MAGLOIRE
DIRECTEUR : M. le Pr. ~~EX~~SETTE

DEPARTEMENTS FEDERATION SANTE

Département de BIOLOGIE HUMAINE
Département d'INNOVATION et de la
COORDINATION PEDAGOGIQUE

DIRECTEUR : M. le Pr. P.A. BRYON
DIRECTEUR : M. le Pr. G. LLORCA

FEDERATION SCIENCES

Institut des SCIENCES DE LA MATIERE

DIRECTEUR : M. le Pr. E. ELBAZ

Institut des SCIENCES DE L'INGENIERIE
ET DU DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE

DIRECTEUR : M. le Pr. G. FONTAINE

Institut de CHIMIE ET BIOLOGIE
MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DIRECTEUR : Mme A. VARAGNAT - M.C.

Institut d'ANALYSE DES SYSTEMES
BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES

DIRECTEUR : M. le Pr. J.M. LEGAY

Institut des SCIENCES ET DE LA TERRE, DE
L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE L'ESPACE
ET DE L'ENVIRONNEMENT

DIRECTEUR : M. le Pr. S. ELMI

UFR DES ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES

DIRECTEUR : M. J. CAMY - Assistant

I.U.T. A

DIRECTEUR : M. le Pr. GIELLY

I.U.T. B

DIRECTEUR : M. le Pr. J. PIVOT

DEPARTEMENTS FEDERATION SCIENCES

Département de 1er cycle pluridisciplinaire
Sciences

DIRECTEUR : M. P. PONCET - M. C.

Département de 2ème cycle

- Sciences de la vie et de la terre
- Sciences pour l'ingénieur
- Sciences de l'analyse et de la matière

DIRECTEUR : M. le Pr. J.P. BLANCHET
DIRECTEUR : M. le Pr. P. BETHEAUX
DIRECTEUR : M. le Pr. J.L. VIALLE

Endotoxins can be little devils



PIERCE

A Pascale avec tout mon amour

A mes parents

A ma famille

A tous mes amis

**Ce travail est également dédié à la mémoire du
Professeur Maurice CARRAZ (Directeur de l'Institut Pasteur
de Lyon) qui avait accepté de diriger cette Thèse.**

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biotechnologie de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne dirigé par Monsieur C. TRAN-MINH. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fourni les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Madame M. BRUNETEAU, Directeur de Recherche au CNRS, et remercier Monsieur le Professeur G. MICHEL de m'avoir reçu dans son laboratoire.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à Madame M. BRUNETEAU qui m'a ouvert les portes du vaste domaine que représentent les Lipopolysaccharides (LPS) et conseillé tout au long de ce travail. Son expérience et sa rigueur m'ont été d'un grand enseignement. Je remercie également l'ensemble de son équipe et plus particulièrement J. PERRET.

Je remercie Monsieur le Professeur J. VILLARD, Doyen de la Faculté de Pharmacie de LYON qui a accepté de présider le jury de cette Thèse.

J'adresse mes très sincères remerciements à Madame M. BRUNETEAU, Directeur de Recherche au CNRS et au Docteur H. MAYER du Max Planck Institut für Immunbiologie de FREIBURG (RFA) qui ont accepté d'évaluer ce travail en temps que Rapporteurs et Membres de mon jury.

Mes remerciements vont également à Mademoiselle M-J. TRANSY de la société Hosal-COT, et à Monsieur C. TRAN-MINH qui ont accepté de participer à mon jury.

J'exprime toute ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et plus particulièrement à M. LAUDE-SHARP de l'Hôpital Broussais (Paris) pour les dosages de l'activité IL-1, M-N. RODANGE et T. CROST de la société Hospal-COT (Meyzieu), à K. HIMMELSPACH du Max Planck Institut für Immunbiologie de FREIBURG (RFA) pour l'analyse par RMN du ^{31}P et à M. CAROFF pour le marquage radioactif des LPS.

J'adresse mes remerciements à Monsieur C. FRITSCH, Directeur technique de la société Hospal-COT et à ses collaborateurs, Mademoiselle M-J. TRANSY, et Messieurs C. PUSINERI et G. VANTARD qui m'ont offert un environnement industriel, des informations techniques et économiques au niveau de l'hémodialyse indispensables pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres de l'École des Mines qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Mes remerciements vont au personnel du laboratoire de Biotechnologie et tout particulièrement à D. CHAVANNE qui a accepté de côtoyer les bactéries, à M-C. BARTHOLIN pour son aide permanente et à H. BESSET pour ses précieux "coup de mains".

J'adresse à B. FESTAZ-FURET et à F. LANTREIBECQ toute mon amitié; leur enthousiasme et leur collaboration m'ont été infiniment précieux.

Que M-C MATHAIS trouve ici le témoignage de toute ma sympathie pour son dévouement et sa compétence tout au long de la frappe de ce manuscrit sur cet outil fabuleux qu'est le Macintosh®. Je remercie également M^r BREUIL, DARLES et LOUBET, et M^{me} AVONDO pour la mise en forme de cette Thèse.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la Région Rhône-Alpes qui m'a alloué une bourse d'étude pendant la durée de cette Thèse.

INTRODUCTION	1
I ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1 - STRUCTURE ET FONCTIONS DU REIN HUMAIN	5
1-1 Structure	5
1-2 Fonctions du rein	5
1-3 Les signes de l'insuffisance rénale	7
2 - STRUCTURE ET FONCTIONS DU REIN ARTIFICIEL	7
2-1 Présentation de l'hémodialyse	7
2-1-1 Principe de l'hémodialyse	9
2-1-2 Schéma d'un dialyseur	9
2-1-3 Biocompatibilité des matériaux	9
2-1-4 Le bain de dialyse	11
3 - LES RÉACTIONS DE TYPE HYPERSENSIBILITÉ LIÉES À L'HÉMODIALYSE	11
4 - LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES BAINS DE DIALYSE	13
5 - CARACTÉRISTIQUES DU GENRE <i>PSEUDOMONAS</i>	15
5-1 Morphologie	15
5-2 Métabolisme	17
5-3 Classification	17
5-4 Pouvoir pathogène	19
5-5 Présentation de <i>Pseudomonas cepacia</i>	19
5-6 Présentation de <i>Pseudomonas testosteroni</i>	19
5-7 Conditions de survie des <i>Pseudomonas</i> dans les solutions utilisées en hémodialyse	21
6 - LES ENDOTOXINES OU LIPOPOLYSACCHARIDES	21
6-1 Historique	21
6-2 Présentation de la paroi bactérienne	23
6-3 Isolement des Lipopolysaccharides	25
6-4 Structure des Lipopolysaccharides	25
6-4-1 Les chaînes O-spécifiques	25
6-4-2 Le "noyau" ou "core"	27
6-4-3 Le Lipide A	27
6-4-4 Les différentes formes de Lipopolysaccharides	27
6-5 Les Lipopolysaccharides des <i>Pseudomonas</i>	29
6-5-1 Le Lipide A	29
6-5-2 Le core ou noyau polysaccharidique	31
6-5-3 La chaîne polysaccharidique O-spécifique	35

7 - FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ENDOTOXINES	37
Remarque à propos du test sur lapin	39
7-1 Le test L.A.L. (Lysat d'Amœbocytes de Limule).....	39
7-2 Capacité d'induction de la synthèse d'interleukine-1 (IL-1).....	41
7-2-1 Présentation de l'interleukine-1 humaine.....	41
7-2-2 Induction de la synthèse d'interleukine-1	41
8 - TEST DE PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE D'HÉMODIALYSE AUX ENDOTOXINES BACTÉRIENNES	43

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 - ISOLEMENT DES BACTÉRIES	47
2 - IDENTIFICATION	47
2-1 Observation vitale.....	47
2-2 Coloration de Gram.....	49
2-3 Galeries d'identification	49
2-4 Choix des souches pour l'étude des LPS	49
3 - CULTURE DES BACTÉRIES	51
4 - EXTRACTION DES LPS	53
4-1 Extraction P.C.P.	53
4-1-1 Préparation du mélange	53
4-1-2 Extraction	53
4-1-3 Ultracentrifugation.....	53
4-2 Extraction par le phénol aqueux à + 68°C.....	55
4-2-1 Extraction	55
4-2-2 Dialyse	55
4-2-3 Action des nucléases.....	55
4-2-4 Ultracentrifugation.....	57
5 - ANALYSE DES LPS PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.....	57
5-1 Conditions d'électrophorèse	57
5-2 Coloration au nitrate d'argent.....	59
5-2-1 Fixation	59
5-2-2 Oxydation	59
5-2-3 Coloration par le nitrate d'argent.....	61
5-2-4 Révélation.....	61

6 - ANALYSE DES LIPOPOLYSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE	
FPLC® ET ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE.....	61
6-1 Analyse par chromatographie de gel filtration FPLC®.....	61
6-2 Analyse des LPS par électrophorèse électroendosmotique préparative	63
7 - ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES LPS.....	65
7-1 Spectre d'absorption	65
7-2 Dosage des protéines	67
7-3 Dosage des hexoses totaux	67
7-4 Dosage de la glucosamine.....	67
7-5 Dosage du KDO par l'acide thiobarbiturique	69
7-6 Dosage du phosphore	69
7-7 Dosage des acides uroniques	71
7-8 Analyse des sucres réduits et acétylés par chromatographie en phase gazeuse	71
7-8-1 Préparation des acétates d'alditols	71
7-8-2 Analyse des acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse	73
7-9 Analyse des acides gras des LPS	75
7-9-1 Extraction des acides gras.....	75
7-9-2 Méthylation des acides gras.....	75
7-9-3 Analyse des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse	75
7-10 Analyse des groupements phosphate par résonance magnétique nucléaire du phosphore ³¹ P.....	77
8 - DOSAGE D'ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES LPS	77
8-1 Dosage de l'activité LAL.....	77
8-2 Dosage de l'activité interleukine-1(IL-1).....	79
9 - ULTRAFILTRATION DES LIPOPOLYSACCHARIDES	81
10 - MARQUAGE RADIOACTIF DES LPS	83
11 - TEST DE PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE DE DIALYSE AUX LPS EXTRAITS ET RADIOMARQUÉS	83

III RÉSULTATS

1 - ÉTUDE DES MICRO-ORGANISMES CONTAMINANTS LES LIQUIDES DE DIALYSE	87
1-1 Identification des micro-organismes présents dans les circuits de dialyse.....	87

1-2 Etude de la répartition des bactéries selon l'origine des prélèvements.....	89
1-3 Choix des souches bactériennes.....	93
1-4 Contrôle de l'identification des souches de <i>Pseudomonas cepacia</i> et <i>Pseudomonas testosteroni</i> retenues.....	93
1-5 Culture en fermenteur	93
2 - EXTRACTION DES LPS	95
2-1 Spectre d'absorption UV des LPS extraits.....	95
2-2 Dosage des protéines	97
3 - ELECTROPHORÈSE DES LPS DE <i>P. cepacia</i> 871101 ET <i>P. testosteroni</i> 871204	97
4 - CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES LPS DE <i>P. cepacia</i> 871101 ET <i>P. testosteroni</i> 871204	99
4-1 Analyse de la composition des LPS	99
4-1-1 Dosages colorimétriques des constituants du LPS.....	99
4-1-1-1 Dosage des hexoses	101
4-1-1-2 Dosage de la glucosamine.....	101
4-1-1-3 Dosage du KDO.....	103
4-1-1-4 Dosage du phosphore	103
4-1-1-5 Dosage des acides uroniques	105
4-1-2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse des oses neutres et des acides gras.....	105
4-1-2-1 Analyse des oses neutres.....	105
4-1-2-2 Analyse des acides gras	111
4-1-3 Analyse des groupements phosphate présents dans le LPS par résonance magnétique nucléaire du phosphore radioactif : ^{31}P	119
4-2 Conclusion de la caractérisation biochimique.....	119
5 - ANALYSE DES LIPOPOLYSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE FPLC® ET ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE.....	121
5-1 Analyse par chromatographie FPLC® des LPS de <i>P. cepacia</i> 871101	125
5-2 Analyse des LPS de <i>P. testosteroni</i> 871204 par électrophorèse préparative	127
6 - MESURE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES LPS	127
6-1 Dosage de l'activité des LPS vis-à-vis du test LAL chromogénique.....	127

6-2 Dosage de la capacité d'induction de la synthèse d'interleukine-1 (IL-1) par des monocytes humains <i>in vitro</i>	131
7 - ULTRAFILTRATION EN CASCADE DES LPS	135
8 - ÉVALUATION DE LA PERMÉABILITÉ DES MEMBRANES D'HÉMODIALYSE AUX LPS RADIOMARQUÉS	137
CONCLUSION	141
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ConA	Conalbumine A
cpm	Coup par minute
CSF	Colony stimulating factor
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOC	Désoxycholate de sodium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylènediamine tetraacétique
FPLC	Fast protein liquid chromatography
(G+C %)	Pourcentage en bases Guanine + Cytosine
H ₂ O PPI	Eau pour préparation injectable
IFN γ	Interféron gamma
IL-1	Interleukine-1
KDO	Acide 2-céto-3-désoxy-manno-octonique
LAL	Lysat d'Amœbocytes de Limule
LPS	Lipopolysaccharide
meq	Milli-équivalent
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide
PGE ₂	Prostaglandine E2
PMNL	Poids moléculaire nominal limite
pNa	Para-nitroaniline
rpm	Rotation par minute
Temed	N,N,N',N' tétraméthyléthylènediamine
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-amino méthane



Le travail que nous présentons s'inscrit dans un cadre général relatif à l'étude des réactions anaphylactoïdes observées au cours de certaines séances d'hémodialyse.

Ces réactions peuvent être liées d'une part à la non biocompatibilité des matériaux qui constituent le système de circulation extracorporelle du sang et d'autre part à la présence de micro-organismes dans les liquides de dialyse.

Cette flore microbienne est constituée essentiellement de bactéries aquaphiles à Gram négatif [BAURMEISTER et coll., 1988], qui renferment à ce titre des Lipopolysaccharides (LPS) au sein de la membrane externe de leur paroi. Ces LPS sont responsables d'un ensemble d'activités biologiques importantes chez l'homme, qui a conduit à leur appellation sous le terme d'Endotoxines.

Plusieurs travaux laissent supposer que la présence de bactéries à Gram négatif dans les liquides de dialyse entraîne un relargage de résidus bactériens divers, notamment des LPS et que ceux-ci sont à l'origine des réactions anaphylactoïdes observées [RAIJ et coll., 1973, MAN et coll., 1988, MONTAGNAC et coll., 1988].

Une meilleure compréhension de ces réactions passe par une meilleure connaissance des bactéries présentes dans les liquides de dialyse et de leur LPS.

Nous nous sommes attachés dans un premier temps, à l'étude de la flore microbienne et plus particulièrement bactérienne rencontrée dans les différents liquides de dialyse. Nous avons ensuite procédé à l'extraction des LPS des espèces bactériennes dominantes, appartenant au genre *Pseudomonas*.

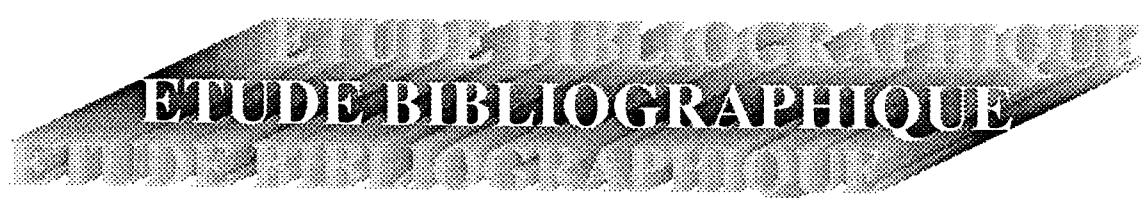
Les connaissances sur les LPS de *Pseudomonas* concernent surtout l'espèce *aeruginosa* à cause de son importance en pathologie infectieuse. Il faut remarquer toutefois que cette espèce n'est pas très fréquente dans les liquides de dialyse.

Nous avons donc entrepris la caractérisation des LPS des deux espèces majoritaires, *cepacia* et *testosteroni* après extraction selon la technique de Galanos [GALANOS et coll., 1969] et la technique de Westphal [WESTPHAL et coll., 1952].

Nous avons étudié d'une part leur composition biochimique et d'autre part évalué leur activité biologique dans le test LAL et dans le test d'induction de la synthèse d'interleukine-1 par des monocytes humains *in vitro*.

Dans une seconde étape, nous avons étudié le comportement des LPS extraits, vis-à-vis de membranes d'ultrafiltration afin de déterminer le seuil de coupure nécessaire pour obtenir une rétention complète des Endotoxines.

Nous avons enfin, en relation avec la société Hospal et le service du Pr Kazatchkine de l'Hôpital Broussais, évalué le transfert des LPS à travers différents types de membranes d'hémodialyse du commerce. Cette expérience a pour but de déterminer si les LPS sont capables de traverser ces membranes et peuvent donc être considérés comme étant à l'origine des réactions anaphylactoïdes observées.



1 - STRUCTURE ET FONCTIONS DU REIN HUMAIN :

Les reins ont un rôle essentiel d'épuration du sang; ils rejettent les produits de déchets sous forme dissoute dans l'urine. Un dysfonctionnement provoque une insuffisance rénale qui entraîne, tout d'abord, une augmentation progressive de la concentration plasmatique d'urée, d'ions potassium et hydrogène, puis l'apparition de convulsions, le coma et la mort en quelques jours.

1-1 STRUCTURE :

Nous ne détaillerons pas la structure du rein. Il faut simplement signaler qu'il est constitué d'unités fonctionnelles appelées néphrons, elles-mêmes composées de plusieurs parties qui ont chacune un rôle précis dans la filtration du sang, son épuration et la production d'urine.

1-2 FONCTIONS DU REIN :

Les deux reins filtrent au niveau de leurs glomérules environ 1700 l de sang en 24 h, ce qui aboutit à la production de 170 litres de filtrat dépourvu de cellules et de protéines plasmatiques. Grâce à des mécanismes de transport actif situés au niveau des cellules du tube rénal, les constituants indispensables contenus dans ces 170 litres de filtrat sont restitués à la circulation. Par voie de conséquence, du fait de l'augmentation de la pression osmotique, une quantité d'eau considérable est réabsorbée passivement .

Toutefois, certains produits, des déchets comme l'urée, les ions K^+ et H^+ ne sont réabsorbés que partiellement. De plus, les cellules tubulaires excrètent activement les K^+ et H^+ dans le liquide tubulaire. Ces substances éliminées attirent, elles aussi, par le phénomène d'osmose une certaine quantité d'eau, qui conduit finalement à une production d'un volume journalier d'urine d'environ 1,5 litre.

Le Tableau 1 nous montre les modifications de la composition de l'urine au cours de l'épuration du sang dans le rein normal.

Constituant	Concentration plasmatique g/l	Quantité dans 170 l de filtrat glomérulaire	Quantité excrétée par l'urine en 24 heures	Quantité réabsorbée dans les tubules
Eau		170 l	1,5 l	168,5 l
Glucose.....	1,00	170 g	0	170 g
HCO ₃ ⁻	1,50	255 g	0,1 g	254,9 g
Na ⁺	3,30	560 g	5 g	555 g
Cl ⁻	3,65	620 g	9 g	611 g
K ⁺	0,17	29 g	2,2 g	26,8 g
Phosphate (en P)	0,03	5,1 g	1,2 g	3,9 g
Ca ⁺⁺	0,1	17 g	0,2 g	16,8 g
Urée.....	0,3	51 g	30 g	21 g
HSO ₄ ⁻ (en S)....	0,02	3,4 g	2,7 g	0,7 g

Tableau 1 : Evolution de la composition du filtrat glomérulaire et de l'urine au cours de la filtration rénale. (D'après SAMSON WRIGHT, 1973).

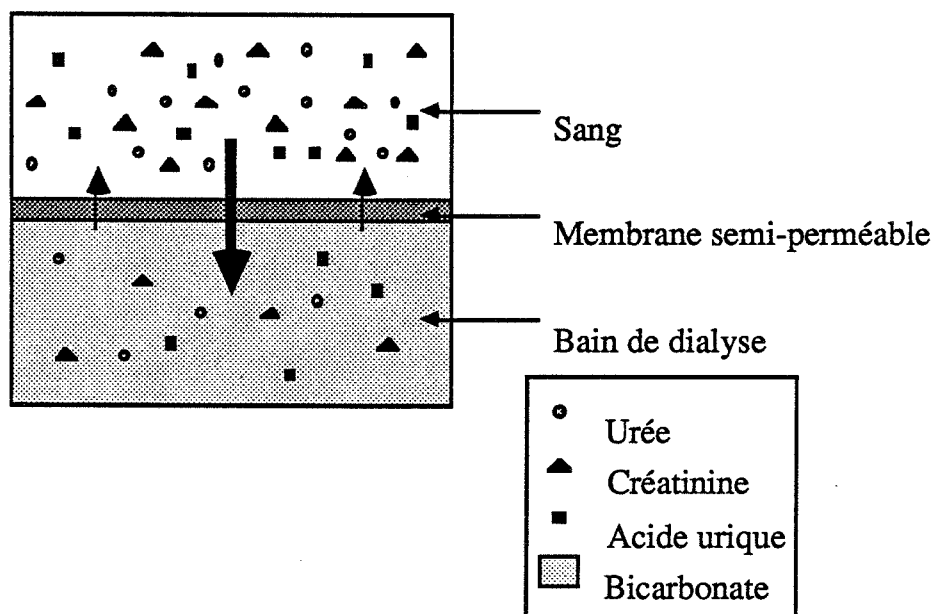


Figure 1: Principe du transfert par diffusion à travers une membrane de dialyse

1-3 LES SIGNES DE L'INSUFFISANCE RÉNALE :

Les trois fonctions principales du rein sont :

- l'excrétion des déchets du métabolisme azoté,
- la régulation du bilan hydro-électrolytique,
- un ensemble de fonctions endocrines et métaboliques.

Le tableau clinique de l'insuffisance rénale dépend de la fonction altérée et de la gravité de l'altération. Les signes cliniques énumérés ci-dessous sont la conséquence de l'insuffisance d'une fonction rénale :

- * insuffisance de l'élimination des composés azotés,
- * acidose,
- * hyperkaliémie,
- * déshydratation cellulaire.

Lorsque au cours de la défaillance rénale, l'état humoral menace la vie du malade, on a recours à l'utilisation du rein artificiel.

2 - STRUCTURE ET FONCTIONS DU REIN ARTIFICIEL :

Le rôle du rein artificiel est de rétablir l'état humoral du patient en mimant le mieux possible la physiologie rénale.

2-1 PRÉSENTATION DE L'HÉMODIALYSE :

L'hémodialyse a été introduite en 1960 par B.H. SCRIBNER, date à partir de laquelle elle s'est répandue progressivement. Elle a bénéficié de progrès techniques permanents qui ont permis de diminuer la durée des séances tout en améliorant leur sécurité et leur efficacité. On compte aujourd'hui plus de 250.000 urémiques dialysés dans le monde.

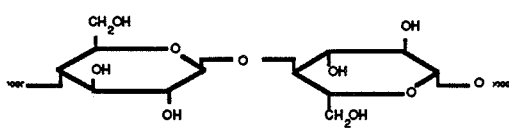
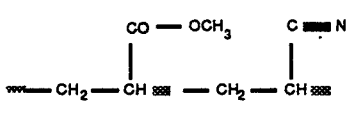
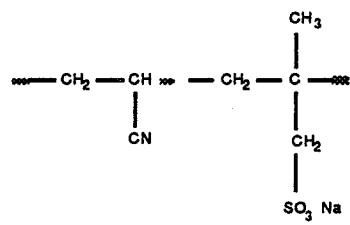
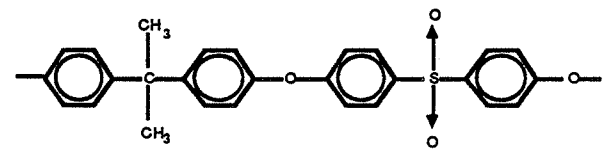
MEMBRANE	STRUCTURE CHIMIQUE	MORPHOLOGIE
CUPROPHAN® Cellulose régénérée (ENKA)		DENSE-SYMETRIQUE
PAN (ASAHI)		ASYMETRIQUE
AN 69® (HOSPAL)		DENSE-SYMETRIQUE
POLYSULFONE (FRESENIUS) (AMICON)		ASYMETRIQUE

Figure 2 : Structure et morphologie des principales membranes d'hémodialyse

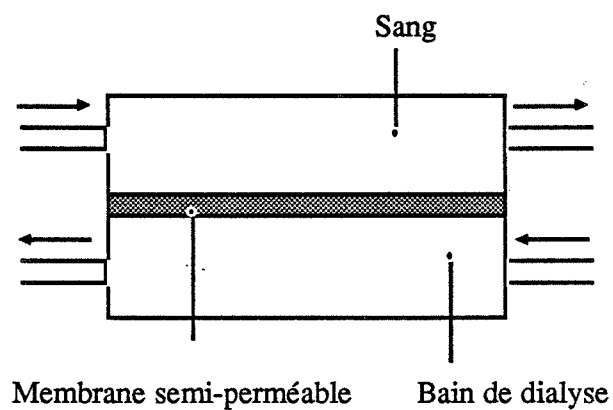


Figure 3 : Schéma d'un dialyseur

2-1-1 Principe de l'hémodialyse :

L'hémodialyse consiste en un échange entre le sang du malade et une solution de composition électrolytique voisine de celle du plasma, à travers une membrane semi-perméable. Son renouvellement périodique (2 à 3 fois par semaine), permet un rééquilibrage de l'état humoral du patient par l'élimination des déchets (urée, créatinine et acide urique) et la normalisation de ses électrolytes plasmatiques (Figure 1).

2-1-2 Schéma d'un dialyseur :

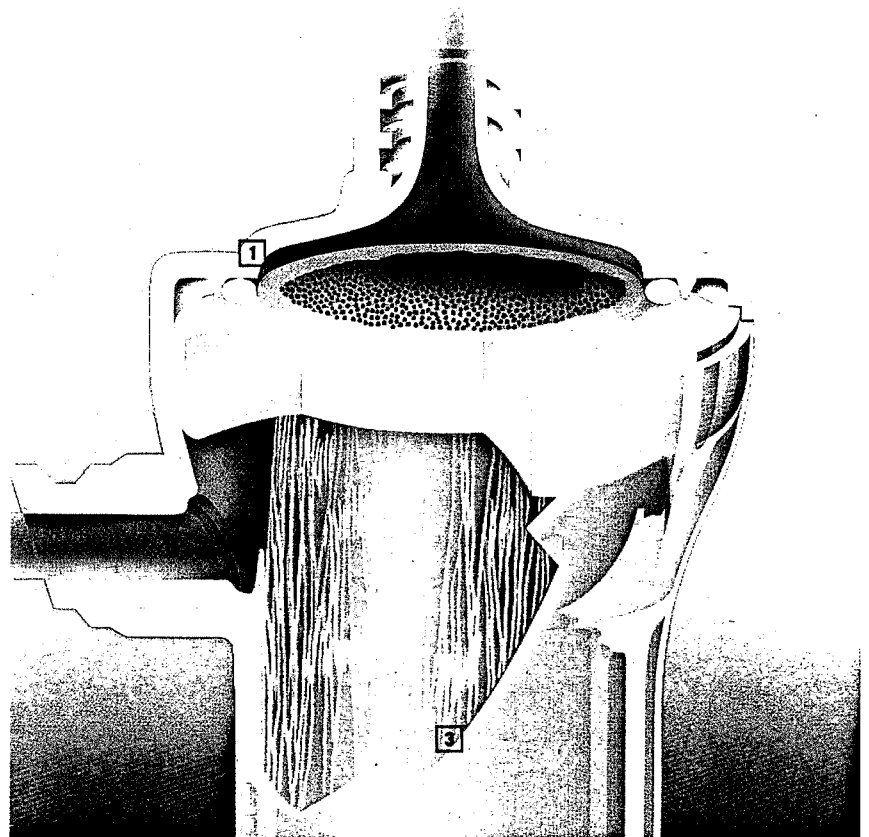
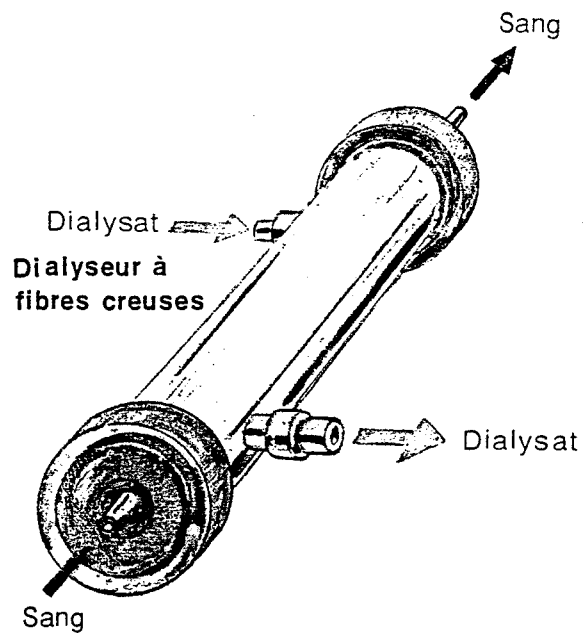
Un dialyseur est composé schématiquement d'une membrane semi-perméable constituée de polymères, qui sont de nature soit cellulosique (cellulose régénérée (Cuprophane®) et acétate de cellulose ...), soit synthétique (polyacrylonitrile, polysulfone ...) (Figure 2). Cette membrane sépare deux compartiments dans lesquels circulent respectivement le sang du malade et le bain de dialyse (Figure 3).

La membrane est conditionnée soit sous forme plane (module plan), soit sous forme de fibres creuses (module cylindrique). On obtient avec les hémodialyseurs à fibres creuses, une surface développée importante (1 m^2 environ) dans un encombrement réduit (cylindre de 25 cm de long pour 7 cm de diamètre) (Figure 4).

2-1-3 Biocompatibilité des matériaux :

L'un des aspects importants de l'hémodialyse est la biocompatibilité des matériaux qui entrent dans la composition du système de circulation extracorporelle du sang, et, plus particulièrement des polymères organiques qui composent la membrane. On observe par exemple, une adhésion des leucocytes, y compris des monocytes, dans le circuit extracorporel, qui conduit à un relargage de produits cellulaires, tels que l'élastase chez les polynucléaires et les monokines, dont l'interleukine-1 (IL-1), chez les monocytes.

Des travaux ont montré que certaines membranes étaient elles-mêmes responsables d'effets biologiques tels que l'activation du complément [KAZATCHKINE et coll, 1988] ou l'induction de la synthèse d'interleukine-1 [LONNEMANN et coll., 1987; LUGER et coll, 1987; BETZ, 1988; BINGEL et coll, 1988; WEINREICH, 1988].



- 1. Embout soudé par ultrason
- 2. Profil interne optimisé
- 3. Fibres entrecroisées

Figure 4 : Schéma d'un hémodialyseur à fibres creuses. (D'après TARDIEU dans L'essentiel sur l'Hémodialyse, Ed Masson).

2-1-4 Le bain de dialyse :

Il existe deux types de bains de dialyse qui diffèrent par la nature du système tampon qu'ils utilisent. Il s'agit d'une solution aqueuse non stérile de composition électrolytique voisine de celle du liquide extra-cellulaire normal, préparée soit à partir d'acétate de sodium ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$), soit à partir de bicarbonate de sodium (NaHCO_3).

Le dialysat à base de bicarbonate permet un rééquilibrage plus rapide du pH du sang du patient, car il évite une étape de métabolisation des composés qui est indispensable avec le dialysat à l'acétate. Les solutions commerciales concentrées sont diluées au cours de la séance d'hémodialyse par un moniteur de dialyse qui contrôle les paramètres suivants : la conductivité, le pH et la température du bain de dialyse. La consommation d'eau pour une séance d'hémodialyse est voisine de 250 litres.

3 - LES RÉACTIONS DE TYPE HYPERSENSIBILITÉ LIÉES À L'HÉMODIALYSE :

En 1984, NOSÉ et RONALD font ressortir l'apparition de réactions anaphylactoïdes observées dans la phase précoce de certaines séances d'hémodialyse. Ces manifestations surviennent dans les 15 minutes après le branchement de la dialyse et se traduisent par des nausées, des malaises, une sensation de chaleur, des symptômes respiratoires (tels que l'œdème laryngé ...), et cardio-vasculaires (tachycardies, chute de la tension artérielle et état de choc) [NOSÉ, 1984, RONALD et coll., 1984, GUYOT et coll., 1984, FORET et coll., 1985, BOUSQUET et coll., 1988]. HAMILTON décrit également les différents mécanismes pouvant conduire à l'observation de ces réactions, selon leur origine [HAMILTON et coll., 1984]

L'augmentation de l'utilisation des membranes à haut flux, favorisant les échanges entre le sang et le dialysat, a accru, en valeur absolue la fréquence de ces observations [MONTAGNAC et coll., 1988]. Toutefois, le pourcentage de réactions anaphylactoïdes observées n'est pas plus important sur les membranes à haut flux que sur les membranes à faible perméabilité (Cuprophane® par exemple).

Le nombre de cas est également en liaison avec la nature des fluides utilisés, l'utilisation de bains concentrés à base de bicarbonate au détriment des bains à base d'acétate semble favoriser leur apparition.

Bain acétate

Composition : (Exemple).

de la solution concentrée de bicarbonate:

- Chlorure de sodium	23,53 g
- Bicarbonate de sodium	65,95 g
- Eau désionisée.....	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 20,13ème :

- Na ⁺	59 meq/l
- Cl ⁻	25,0 meq/l
- HCO ₃ ⁻	34,0 meq/l

de la solution concentrée acide :

- Chlorure de sodium	172,19 g
- Chlorure de calcium, 6H ₂ O	14,11 g
- Chlorure de magnésium, 6H ₂ O	3,74 g
- Chlorure de potassium	5,49 g
- Acide acétique	8,85 g
- Eau désionisée.....	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 36,83ème :

- H ⁺	4,0 meq/l
- Na ⁺	80,0 meq/l
- Ca ²⁺	3,5 meq/l
- Mg ²⁺	1,0 meq/l
- K ⁺	2,0 meq/l
- Cl ⁻	86,5 meq/l
- CH ₃ COO ⁻	4,0 meq/l

Le bain de dialyse dilué au bicarbonate est constitué du mélange de la solution de bicarbonate et de la solution acide. Les concentrations finales étant la somme des concentrations indiquées pour chaque solution diluée .

Composition :

de la solution concentrée d'acétate:

- Chlorure de sodium	204,75 g
- Chlorure de calcium, 6H ₂ O	13,37 g
- Chlorure de magnésium, 6H ₂ O	5,32 g
- Chlorure de potassium	3,92 g
- Acétate de sodium, 3H ₂ O	166,6 g
- Eau désionisée.....	qsp 1 litre

de la solution diluée au 1 / 35ème :

- Na ⁺	135,0 meq/l
- Ca ²⁺	3,5 meq/l
- Mg ²⁺	1,5 meq/l
- K ⁺	1,5 meq/l
- Cl ⁻	106,5 meq/l
- CH ₃ COO ⁻	35,0 meq/l

Tableau 2 : Composition des bains de dialyse concentrés et dilués à base de bicarbonate et d'acétate.

4 - LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES BAINS DE DIALYSE :

De nombreux travaux ont été entrepris pour tenter d'expliquer l'origine des réactions anaphylactoïdes. Des résidus de fabrication, tels que l'oxyde d'éthylène, les isocyanates, le formol, et les oligomères de cellulose ont été identifiés comme des facteurs potentiels.

Toutefois, il semble que, le plus souvent, la qualité biologique du dialysat soit à l'origine des réactions anaphylactoïdes observées [WAMBERGUE et coll., 1984]. L'infrastructure du centre de dialyse peut influencer sur la qualité biologique du dialysat. La conception générale du circuit de traitement de l'eau [BOMMER et coll., 1987a, DU MOULIN et coll., 1987], le respect des protocoles de désinfection et de maintenance des moniteurs de dialyse sont autant de paramètres qui ont leur importance dans le bon fonctionnement d'un centre d'hémodialyse. Leur optimisation permet de réduire notablement le nombre de micro-organismes.

D'après la Pharmacopée Européenne IV^{ème} édition, aucune norme, sur le nombre maximum de germes admissibles dans les concentrés de dialyse n'est clairement définie; elle recommande simplement, sur le plan microbiologique, l'utilisation de liquides les plus propres possibles. La température et le temps de conservation des concentrés jouent un rôle important dans le développement des micro-organismes contaminants. De ce fait, les bains de dialyse concentrés sont souvent le siège d'une contamination microbienne non négligeable [BAURMEISTER et coll, 1988, EBBEN et coll., 1987]. Les solutés à base de bicarbonate présentent un taux de contamination très supérieur aux solutés à base d'acétate, en raison d'une concentration en sel plus faible et d'un pH légèrement alcalin. Le Tableau 2 indique la composition des bains de dialyse concentrés et dilués.

Des études d'identification de ces micro-organismes ont été réalisées par différentes équipes [JANS et coll 1978; JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988]. Elles ont montré que la presque totalité des germes isolés étaient des bactéries, dont une très large majorité de bacilles à Gram négatif.

L'identification bactérienne montre une prédominance des bactéries aquaphiles appartenant au genre *Pseudomonas* [JANS et coll 1978; JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988] résultats que nous avons confirmés au laboratoire. Outre les *Pseudomonas*, certains auteurs ont identifié, dans des proportions plus faibles, des bactéries appartenant aux genres *Moraxella* et *Acinetobacter* [BAURMEISTER et coll, 1988].

Dès 1973, des travaux de RAIJ ont montré que les réactions anaphylactoïdes développées au cours des séances d'hémodialyse, étaient en fait corrélées à une contamination bactérienne du dialysat [RAIJ et coll, 1973]. Ces résultats ont été confirmés

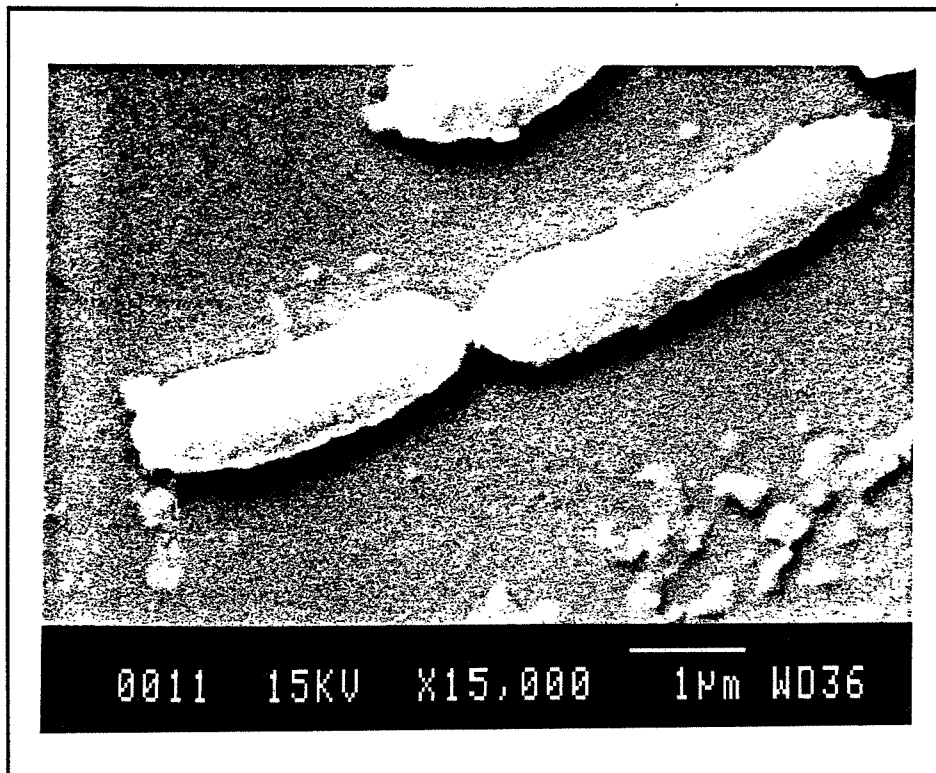


Figure 5 : Observation en microscopie électronique à balayage de *Pseudomonas cepacia* (Centre de Microscopie Électronique, Ecole des Mines de Saint-Etienne).

récemment par MAN et MONTAGNAC [MAN et coll., 1988, MONTAGNAC et coll, 1988] à partir de deux observations sur des patients dialysés depuis une dizaine d'années.

En effet, les bactéries qui se développent dans les bains de dialyse sont susceptibles de relarguer certaines substances porteuses d'activité biologique, qui peuvent être à l'origine des phénomènes observés. La presque totalité des bactéries qui sont identifiées dans les dialysats, sont de type Gram négatif et renferment donc au niveau de la membrane externe de leur paroi, des molécules complexes appelées "Lipopolysaccharides" (LPS) en raison de leur structure, ou Endotoxines en raison de leurs activités biologiques.

Ces composés ont, au niveau de la paroi, un rôle structural et immunologique. Ils sont également porteurs d'une forte activité toxique, comparable à celle de l'arsenic, ce qui signifie que des quantités infimes de LPS peuvent être à l'origine de réactions biologiques importantes, qui peuvent se traduire, au niveau de l'hémodialyse par les réactions anaphylactoïdes décrites précédemment. D'autres produits bactériens, les exotoxines, peuvent être incriminés, ils sont également porteurs de très fortes activités biologiques, toutefois leur stabilité est beaucoup plus faible.

5 - CARACTÉRISTIQUES DU GENRE *PSEUDOMONAS*

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* qui comprend également les genres *Xanthomonas*, *Frateria*, et *Zooglae*.

Leur présence au contact de l'homme est assez rare, elles vivent principalement dans l'eau et dans le sol ; certaines souches sont halophiles.

A cause de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques, ce qui favorise leur sélection en milieu hospitalier.

5-1 MORPHOLOGIE

PALLERONI définit dans la 9^{ème} édition du "Bergey's Manual" [PALLERONI, 1984] l'aspect microscopique des *Pseudomonas* comme des bacilles rigides, droits ou légèrement incurvés avec des extrémités arrondies, mais jamais spiralés. Elles ont un diamètre de 0,5 à 1 μm et une longueur pouvant osciller entre 1,5 et 5 μm . Elles sont généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. La Figure 5 représente une bactérie du genre *Pseudomonas* observée en microscopie électronique à balayage.

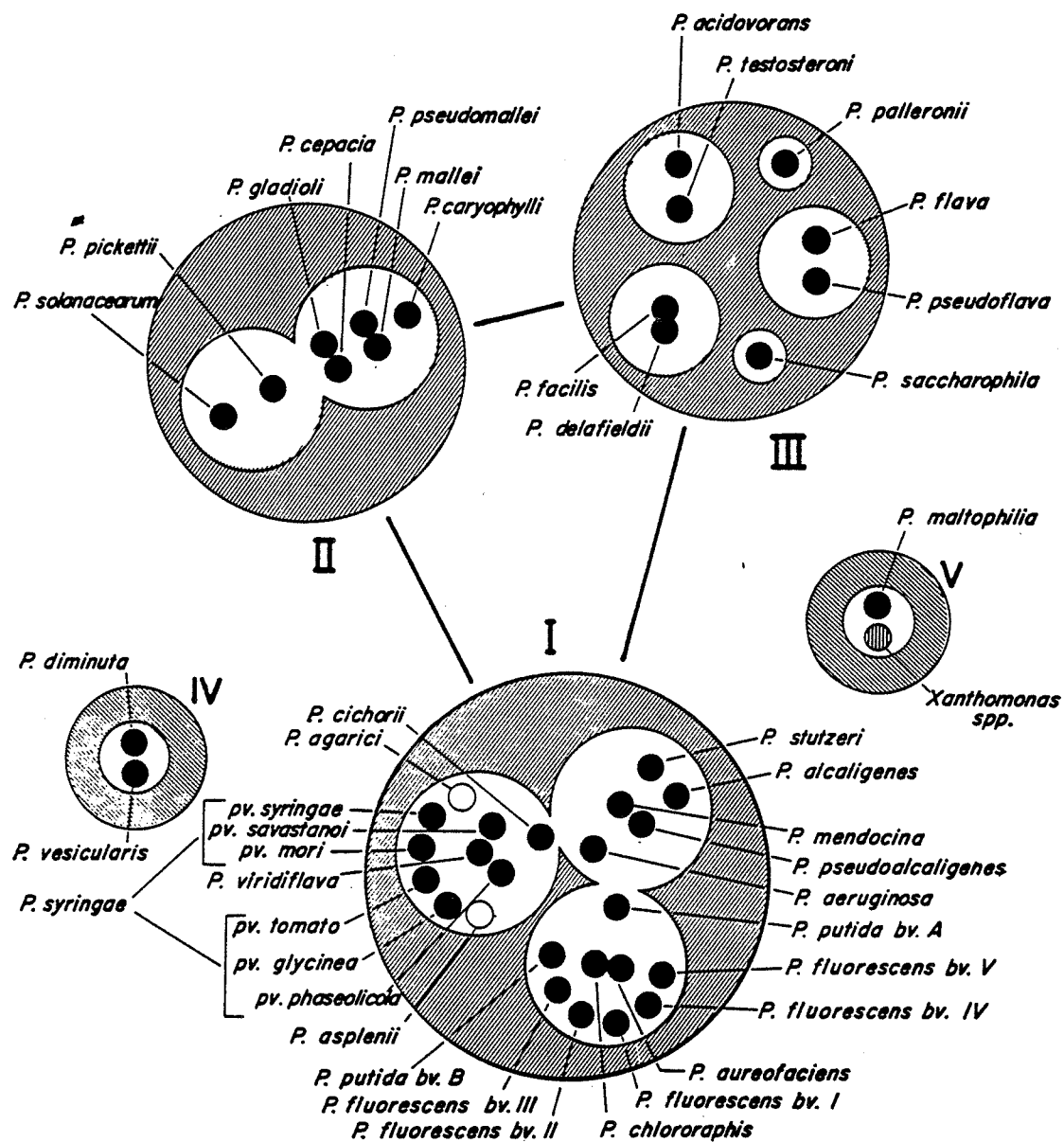


Figure 6: Classification des différentes espèces du genre *Pseudomonas* selon leurs groupes génomiques, établie à partir d'expériences d'hybridation de l'ADN et de l'ARNr. (D'après PALLERONI, 1984)

Après coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous la forme de bacilles à Gram négatif colorés uniformément ou avec un aspect bipolaire. Les bacilles sont généralement isolés ou en petits amas; des formes longues peuvent être observées dans les vieilles cultures.

Ces bactéries ne forment jamais de spore et ne possèdent pas de capsule. Certaines souches produisent cependant une substance muqueuse (slime) qui peut former un halo réfringent péribacillaire. Leur (G+C)% est compris entre 58 et 70 %.

PALLERONI a affiné la classification des *Pseudomonas* en proposant cinq groupes génomiques déterminés à partir d'expérience d'hybridation de l'ADN et de l'ARNr des différentes espèces. (Figure 6)

5-2 MÉTABOLISME :

Les *Pseudomonas* sont des germes saprophytes aérobies stricts, avec l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Toutefois, en anaérobiose, certaines *Pseudomonas* peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final, on parle alors de "respiration anaérobie". Ce sont des bactéries chimioorganotrophes, capables d'utiliser un grand nombre de substrats carbonés comme seule source d'énergie. Quelques espèces sont chimiolithotrophes facultatives, elles peuvent utiliser le monoxyde de carbone (CO) ou l'hydrogène comme source d'énergie. Elles ne dégradent jamais le glucose par voie fermentative. Elles sont oxydase positive, à l'exception de *Pseudomonas maltophilia*, et catalase positive; elles ne nécessitent aucun facteur de croissance.

Ces germes, peu exigeants, se cultivent sur des milieux ordinaires tamponnés à des pH assez dispersés autour de pH = 7. Les *Pseudomonas* ne se développent pas à pH < 4,5.

5-3 CLASSIFICATION :

En raison de l'absence de fermentation des sucres, l'étude des biotypes des *Pseudomonas* est basée sur quelques caractères traditionnels tels que : oxydase, arginine dihydrolase, uréase, β -glucosidase, respiration anaérobie des nitrates ... et sur des tests d'assimilation des sucres.

LE MINOR et VERON ont établi pour les principales espèces un tableau récapitulatif des différents caractères d'identification en fonction de leur groupe génomique (Tableau 3) [LE MINOR et coll, 1984].

CARACTERES ^(a) D'IDENTIFICATION	GROUPES GENOMIQUES																
	Ia			Ib		Ic		IIa			IIb	III	IV		V	Nd	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>P. pseudomallei</i>	<i>P. mallei</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. pickettii</i>	<i>P. acidovorans</i>	<i>P. testosteroni</i>	<i>P. diminuta</i>	<i>P. vesicularis</i>	<i>P. maltophilia</i>	<i>P. paucimobilis</i>
Nombre de flagelles	1	> 1	> 1	1	1	1	1	> 1	0	> 1	1	> 1	> 1	1	1	> 1	1
Réserves de poly-β-hydroxybutyrate	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4° C	+	-	a	-	+	+	+	+	a	a	+	a	a	a	+	+	-
Croissance à 41° C	+	-	-	a	+	+	+	+	a	a	+	a	a	a	+	+	-
Auxotrophie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	+	+	a
Utilisation comme seule source de carbone et d'énergie :																	
Acétate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Nd
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Nd
Tréhalose	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	Nd
Maltose	-	-	-	+	-	-	-	+	a	+	-	a	-	-	+	+	Nd
Inositol	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	a	-	-	-	-	Nd
Mannitol	+	+	-	a	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Nd
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	a	-	-	-	-	Nd
Réaction de l'oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Respiration des nitrates	+	a	+	+	+	+	+	+	a	-	+	-	-	-	-	-	+
Arginine-dihydrolase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Clivage des diphenols (b)	Or	Or	Or	Or	Or	-	-	Or	Or	Or	Or	Me	Me	-	-	-	Nd
Acidification oxydative du :																	
Glucose (c)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Mannose	a	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactose	-	a	a	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Maltose	-	a	a	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Mannitol	a	+	a	a	-	-	-	+	a	+	-	+	-	-	a _r	-	+
Hydrolyse de glycosides :																	
ONPG	a	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	+	+	+
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	+	+	+
Lysine-décarboxylase	-	-	-	-	d	d	d	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Phénylalanine-désaminase	-	-	-	d	d	d	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de macromolécules :																	
Amylase	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	a
Gélatinase	a	+	-	-	-	-	-	+	a	a	a	-	-	a	+	+	-
Lécithinase	a	+	-	-	-	-	-	a	a	a	a	-	-	-	-	+	-
Désoxyribonucléase	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Production de pyocyanine	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de pyoverdine	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	a	a	-	-	-	a	+	a	a	-	-	a	a	a	-	+	a
Sensibilité à la polymyxine	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	a	a	a	a	+	a

(a) +, -, caractère présent ou absent chez plus de 80 p. 100 des souches ; d = résultat positif chez 20 à 80 p. 100 des souches ; Nd = non déterminé. Lecture des réactions après 48 h d'incubation à 30°C (sauf indication contraire).

(b) Clivage des diphenols (Stanier et coll., 1966) : Or = clivage en "ortho" ; Me = clivage en "méta" ; - = absence de clivage.

(c) +, acidification rapide en 24 h ; +_r = acidification discrète, apparaissant souvent après 48 h ou 72 h d'incubation ; d et d_r, résultats divers. Culture en milieu de Hugh et Leifson ou en MEVAG. D'après Gilardi (1978).

Tableau 3 : Caractères d'identification des principales espèces de *Pseudomonas*. (D'après LE MINOR, L., Bactériologie Médicale, 1982, Flammarion Médecine Sciences).

5-4 POUVOIR PATHOGENE :

Pseudomonas aeruginosa est incluse sur le plan médical dans la liste des bactéries pathogènes. Un certain nombre de facteurs de pathogénicité ont été décrits : Hémolysine, Phospholipase, Protéase, Exotoxine, Entérotoxine et Endotoxine.

Pseudomonas aeruginosa représente 60 à 80 % des souches de *Pseudomonas* isolées par les laboratoires d'analyses médicales.

Cependant d'autres espèces ont une relative importance en bactériologie médicale. C'est le cas par exemple de l'espèce *cepacia* que l'on peut définir comme un agent "pathogène opportuniste". Cette bactérie est souvent responsable de surinfection pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose. Elle est également fréquemment isolée en centre de dialyse, ainsi qu'une autre espèce : *testosteroni* nettement moins connue

5-5 PRÉSENTATION DE *PSEUDOMONAS cepacia* :

Pseudomonas cepacia appartient au groupe génomique II (cf Figure 6). Elle a été décrite en 1950 comme un germe phytopathogène, mais aujourd'hui, son importance en tant que bactérie "pathogène opportuniste" augmente régulièrement. Son isolement se fait à partir de prélèvements hospitaliers divers : eau du robinet, eau distillée, solutés injectables, appareil d'hémodialyse, humidificateurs, solutions antiseptiques, instruments, sonde, cathéters, etc On peut également isoler ce germe sur des plaies surinfectées.

L'eau sous toutes ses formes est donc la source essentielle de contamination en milieu hospitalier. *Pseudomonas cepacia* est une bactérie très peu exigeante, capable de survivre pendant des périodes très longues (quelques mois) dans des conditions minimales de nutrition. Cette espèce est remarquable par sa capacité à utiliser une grande variété de substrats divers comme source de carbone et d'énergie. Cette particularité permet d'expliquer la grande variété des sources potentielles de contamination.

5-6 PRÉSENTATION DE *PSEUDOMONAS testosteroni* :

Pseudomonas testosteroni appartient au groupe génomique III (cf Figure 6). Elle doit son nom à sa possibilité d'assimiler la testostérone.

Les tests biochimiques d'identification sont presque tous négatifs, ce qui rend difficile une détermination précise du biotype.

Cette espèce est isolée parfois en bactériologie médicale à partir de prélèvements divers (urine, sang, pus, eau...) avec une fréquence d'observation toutefois plus faible que pour *Pseudomonas cepacia*.

5-7 CONDITIONS DE SURVIE DES *PSEUDOMONAS* DANS LES SOLUTIONS UTILISÉES EN HÉMODIALYSE :

Les souches bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* sont des hôtes fréquents des solutions aqueuses utilisées en hémodialyse [JANS et coll 1978; JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988]. Ceci réside, comme nous l'avons précédemment mentionné, dans leur capacité à se maintenir en vie dans des conditions minimales de nutrition où d'autres bactéries ne peuvent survivre.

Le développement de ces germes est toutefois limité. Ils peuvent croître en utilisant comme nutriments, soit les déchets provenant de la lyse d'autres bactéries présentes initialement, soit les quelques composés organiques contenus dans ces solutions aqueuses.

Au cours de leur survie dans les bains d'hémodialyse ou dans les systèmes de traitement des eaux, les *Pseudomonas* relarguent une quantité non négligeable de résidus dont les plus stables et les plus importants sur le plan de la toxicité sont les Endotoxines.

6 - LES ENDOTOXINES OU LIPOPOLYSACCHARIDES

6-1 HISTORIQUE

On doit le terme "Endotoxine" à PFEIFFER, qui en 1892 observa deux toxines distinctes au cours d'une étude du *Vibrio cholerae* :

- une **exotoxine** thermolabile, excrétée dans le milieu de culture durant la croissance,
- une toxine thermostable, qui est relarguée seulement après désintégration des cellules et appelée, par opposition, **endotoxine**.

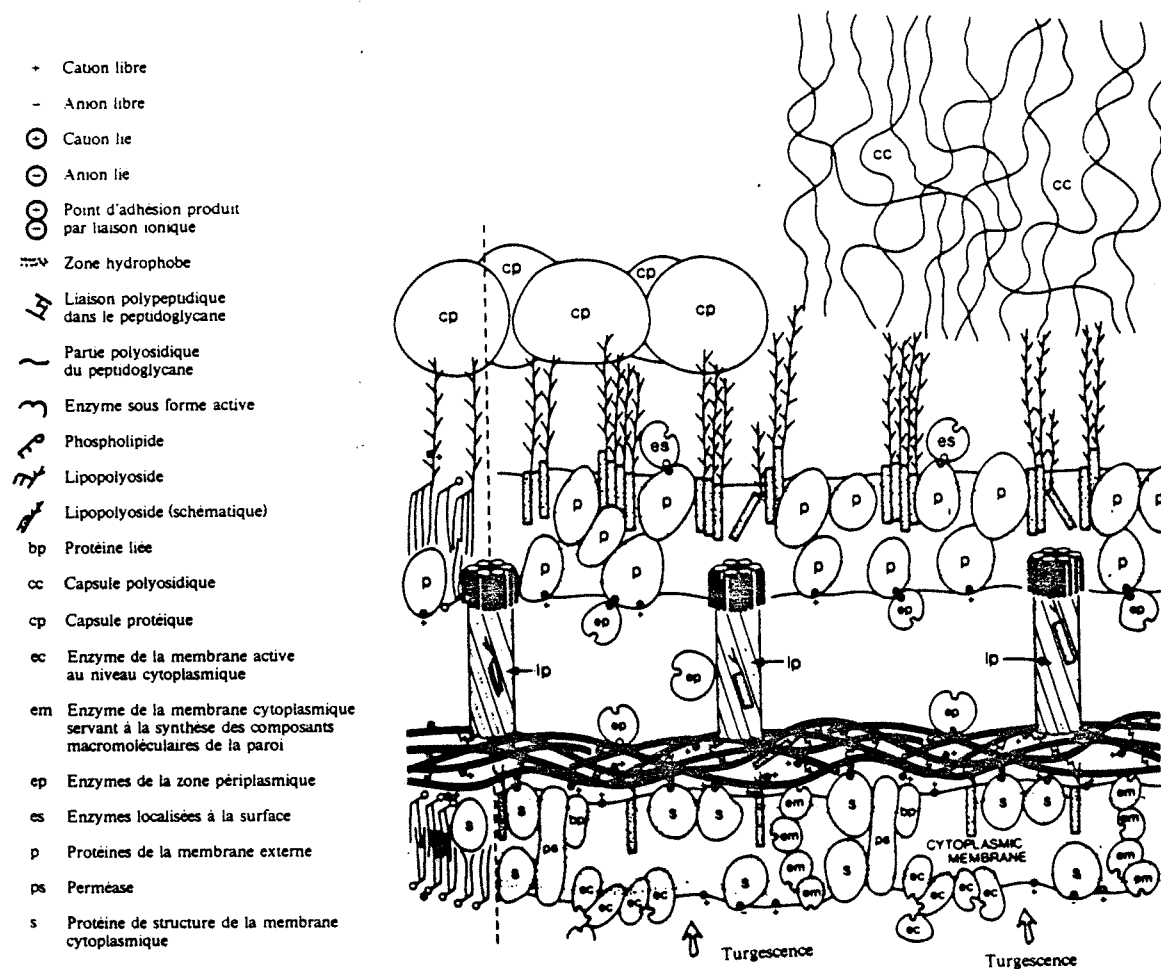


Figure 7 : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif. (D'après COSTERTON, J.W., 1977, Microbiology-1977, American Society of Microbiology, Washington).

En 1894 CENTANNI qualifia l'endotoxine de "pirotoxina" à cause de sa très grande activité pyrogène [CENTANNI, 1894].

Cette endotoxine a ensuite été identifiée chez toutes les bactéries de type Gram négatif comme un élément constitutif de la paroi.

C'est en 1933 que BOIVIN a extrait le facteur responsable de la toxicité des bactéries Gram négatif tuées [BOIVIN et coll, 1933].

De nature lipopolysaccharidique, les endotoxines ont un pouvoir toxique un peu plus faible que les exotoxines protéiques, mais celui-ci n'est neutralisé ni par le formol, ni par un antisérum. Leur stabilité est également beaucoup plus grande.

6-2 PRÉSENTATION DE LA PAROI BACTÉRIENNE

La paroi des bactéries à Gram négatif est composée de trois couches distinctes (Figure 7).

Depuis l'intérieur de la cellule nous trouvons :

- La membrane cytoplasmique, constituée essentiellement d'une bicouche phospholipidique et de protéines. Son rôle est surtout de permettre le transport actif de tout élément entrant ou sortant de la cellule grâce à des protéines spécifiques.
- Le peptidoglycane ou mucopeptide confère à la paroi sa rigidité, et impose sa forme à la bactérie. Sa structure fait apparaître de longues chaînes formées d'acide muramique N-acétylé et de glucosamine N-acétylée. La liaison entre les chaînes est assurée par des ponts peptidiques composés de quelques acides aminés.
- La membrane externe agit comme un filtre moléculaire avec une limite d'exclusion définie pour les solutés hydrophiles. Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique, de protéines et d'une quantité importante d'une macromolécule, appelée en raison de sa composition chimique : lipopolysaccharide (LPS). Les LPS sont présents uniquement sur la face externe de la membrane et lui confèrent donc une structure asymétrique.

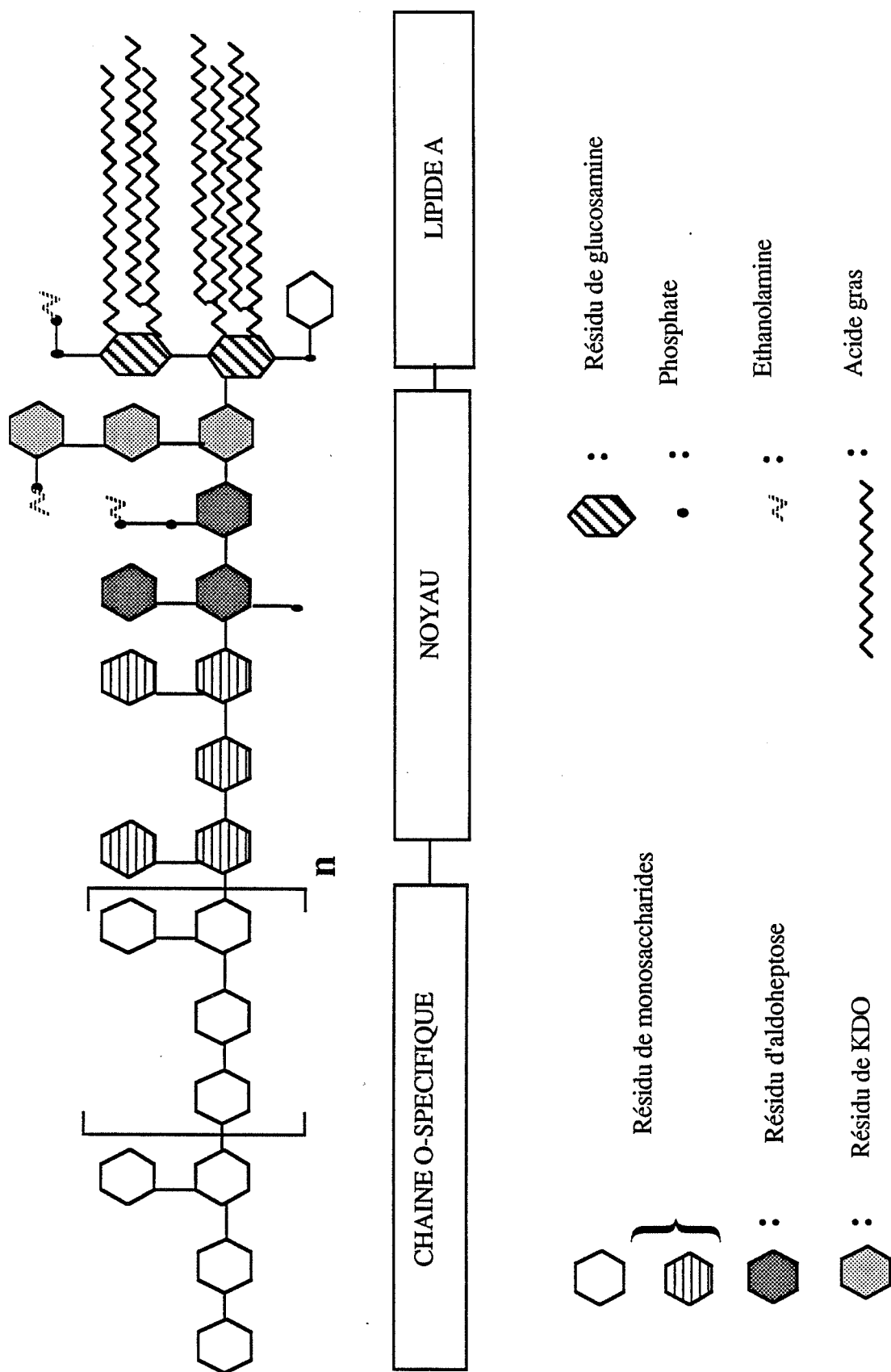


Figure 8 :

SCHEMA DE LA STRUCTURE DES LIPOPOLYSACCHARIDES DES SALMONELLES

(D'après : Rietschel E.Th., 1988).

Les lipopolysaccharides représentent environ 25 % de la surface de la cellule. Leur rôle est tout d'abord structural, mais également immunologique. Ils contiennent l'antigène somatique "O" qui permet la discrimination des différents groupes sérologiques au sein d'une même espèce bactérienne.

6-3 ISOLEMENT DES LIPOPOLYSACCHARIDES

Il existe de nombreuses techniques d'extraction des LPS qui sont pratiquées soit à partir de bactéries complètes soit à partir de préparation d'enveloppes bactériennes.

Les deux méthodes les plus répandues sont :

- une méthode douce faite à température ambiante par une extraction phénol - chloroforme - éther de pétrole (P.C.P.) développée par GALANOS [GALANOS et coll, 1969],
- une méthode plus drastique par une extraction au phénol aqueux à chaud décrite par PALMER et GERLOUGH [PALMER et coll, 1940] et modifiée par WESTPHAL [WESTPHAL et coll, 1952].

Ces deux techniques sont décrites de manière détaillée dans la partie Matériels et Méthodes.

6-4 STRUCTURE DES LIPOPOLYSACCHARIDES

Les LPS sont des molécules composées de trois régions principales (Figure 8) :

- les chaînes latérales O spécifiques;
- le "core" également appelé noyau polysaccharidique;
- le lipide A.

6-4-1 Les chaînes O-spécifiques:

Elles sont constituées d'unités répétitives d'oligosaccharides dont la composition et l'enchaînement sont propres à chaque souche.

6-4-2 Le "noyau" ou "core":

La structure du noyau est la même pour toutes les souches d'une même espèce, et elle est commune ou très voisine pour toutes les espèces d'un même genre. Le noyau est composé d'un enchaînement de monosaccharides contenant en général une ou plusieurs molécules d'acide 2-céto-3-désoxy-D-manno-octonique communément appelé KDO.

6-4-3 Le Lipide A :

Il est lié au noyau polysaccharidique par l'intermédiaire du KDO. Il contient des acides gras et un ose aminé : la glucosamine.

On retrouve le caractère polydispersé des LPS dans la plupart des préparations. Il s'agit de molécules constituées essentiellement de deux parties :

- un complexe polysaccharidique (core + chaîne O-spécifique) qui représente le pôle hydrophile et,
- un complexe lipidique (lipide A) qui constitue le pôle hydrophobe.

A cause de leur caractère amphiphile, les LPS en solution dans l'eau ont tendance à s'agréger pour former des micelles de tailles très variables.

6-4-4 Les différentes formes de Lipopolysaccharides

Selon leur structure, les LPS sont séparés en deux types principaux.

Les LPS les plus courts, constitués du lipide A et du core polysaccharidique uniquement, sont les formes R, de l'anglais "Rough" qui signifie rugueux. Ce qualificatif traduit l'aspect macroscopique des colonies bactériennes, après culture sur milieu solide, des mutants qui ont perdu la capacité de fixer la chaîne O-spécifique.

Par opposition, les LPS composés des trois parties décrites précédemment (lipide A + core + chaîne O-spécifique) procurent à la colonie bactérienne un aspect macroscopique lisse (Smooth en anglais). Ces LPS sont donc appelés LPS de forme S.

Il existe également une forme intermédiaire, qui est la forme SR, pour laquelle la chaîne O-spécifique est constituée uniquement d'une sous-unité répétitive.

Yields are expressed as percentage of whole cell walls, other results as percentages of lipopolysaccharides (AqI)

Determination	Species					
	<i>P. diminuta</i>	<i>P. pavonacea</i>	<i>P. rubescens</i> O	<i>P. rubescens</i> T	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. synchyanea</i>
	%	%	%	%	%	%
Yield	9.3	20.4	14.4	15.0	21.5	23.2
Phosphorus	0.71	3.37	3.98	4.12	5.48	4.37
Nitrogen	2.3	2.6	2.6	2.3	2.9	2.4
Fatty acid	27.8	28.5	31.2	34.5	24.2	12.4
Total carbohydrate	41.0	19.3	18.0	16.7	9.6	42.5
Glucose	7.0	1.1	4.6	4.9	<0.2	8.2
Galactose	0	11.8	5.4	5.7	0	0
Mannose	12.5	0	0	0	0	0
Rhamnose	0	0	0	0	3.0	18.5
Ribose	0	0	Trace	0	0	8.7
Heptose	13.4	<1	6.9	7.4	7.3	6.8
2-Keto-3-deoxyoctonic acid	8.3	3.7	<0.2	<0.1	5.2	4.3

Lipopolysaccharides (AqI) were hydrolysed with 6.1 N HCl at 105 °C for 4 h. Results, obtained by autoanalysis, are calculated for residues of amino compounds, without correction for destruction or slow release during hydrolysis; +, present but not determined

Component	Species					
	<i>P. diminuta</i>	<i>P. pavonacea</i>	<i>P. rubescens</i> O	<i>P. rubescens</i> T	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. synchyanea</i>
	%	%	%	%	%	%
Glucosamine	0	4.06	5.03	5.62	7.20	4.96
Glucosamine phosphate	0	2.23	4.45 ^a	4.60 ^a	1.91	1.73
Galactosamine	0	0	0.76	0	5.40	1.98
Quinovosamine ^b	0	0	0	0	1.85	0.41
Fucosamine ^b	0	0	0.69	0	0	0
Ethanolamine	0	0	0.17	0.17	0	0
Ethanolamine phosphate	0	0	+	+	0	0
Aspartic acid	0.56	2.61	0.30	0.17	0.14	0.09
Alanine	0.45	0.46	0.37	0.17	0.12	1.20
Lysine	0.23	0.34	0.48	1.04	0.18	0.15
Arginine	0.41	0.18	0.35	1.07	0.32	Trace
Other amino acids (total)	2.02	2.05	2.13	0.69	0.57	0.42

^a Includes contribution from ethanolamine phosphate.

^b Calculated assuming a molar colour yield equal to that for glucosamine.

Results are expressed as percentages of the total fatty acids

Fatty acid	Species					
	<i>P. diminuta</i>	<i>P. pavonacea</i>	<i>P. rubescens</i> O	<i>P. rubescens</i> T	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. synchyanea</i>
	%	%	%	%	%	%
10:1	0	0	0	0	4.8	1.4
12:0	0.4	29.9	Trace	5.5	40.4	26.2
12:1	4.8	5.3	0.4	0.8	9.1	7.6
iso-13:0	0	0	8.7	18.9	0	0
13:0	0	0	7.1	9.5	0	0
br-13:1	0	0	1.4	1.3	0	0
13:1	1.9	0.5	3.3	2.9	0	0
14:0	9.1	0	0	0	0	0
14:1	4.5	3.6	2.1	2.1	2.0	0
br-15:1	0	0	2.1	1.8	0	0
20H-12:0	0	0	0	0	0	13.0
30H-10:0	0	0	0	0	12.4	18.2
30H-11:0	0	1.6	6.4	7.7	0	0
30H-12:0	46.8	47.1	10.3	9.8	22.3	29.3
br-30H-13:0	0	0	16.0	11.4	0	0
30H-13:0	8.7	2.4	29.7	17.8	0	0
30H-14:0	20.3	5.5	6.9	5.7	3.3	0
br-30H-15:0	0	0	2.4	2.2	0	0
Other acids (total)	3.5	4.1	3.2	2.6	5.7	4.3

Tableau 4 : Analyse de la composition chimique des lipopolysaccharides de différentes espèces de *Pseudomonas*. (D'après WILKINSON et coll., 1973).

Les LPS les plus étudiés sont ceux des bactéries appartenant à la famille des Entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* ...). La littérature consacrée aux LPS des *Pseudomonas* est peu abondante et concerne presque essentiellement l'espèce *aeruginosa* eu égard à son importance en pathogénie.

6-5 LES LIPOPOLYSACCHARIDES DES *PSEUDOMONAS* :

Dans une première étude, WILKINSON [WILKINSON, 1970] donne succinctement la composition de la paroi de quelques espèces sensibles à l'EDTA. Dans une seconde étape, WILKINSON [WILKINSON et coll, 1973] réalise une étude assez complète de la composition de la paroi et des LPS de différentes espèces de *Pseudomonas* sensibles ou résistantes à l'EDTA, après culture sur milieu nutritif. Les résultats concernant les lipopolysaccharides sont montrés dans le Tableau 4.

On peut remarquer les faits suivants :

- Les rendements d'extraction des LPS oscillent entre 9,3 % du poids sec de la paroi pour *Pseudomonas diminuta* et 23,2 % pour *Pseudomonas syncyanea*.
- La teneur en phosphore est assez faible pour *Pseudomonas diminuta* comparativement aux autres espèces testées.
- Le pourcentage de KDO est très variable selon les espèces, sa valeur étant très faible pour *Pseudomonas rubescens*.
- La composition en acides gras est très différente d'une espèce à l'autre.

D'autres études ont permis d'affiner ces premiers résultats. Nous nous proposons d'en faire la synthèse en traitant séparément les différentes régions qui composent la molécule de LPS.

6-5-1 Le Lipide A

KROPINSKI [KROPINSKI et coll., 1985] indique que le LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ressemble à celui des Salmonelles. Il souligne, en outre, que l'élément de base du lipide A est comme chez de nombreuses espèces un dissaccharide formé de deux molécules de glucosamine reliées par une liaison β 1—>6. Ce dissaccharide est généralement diphosphorylé (Figure 9).

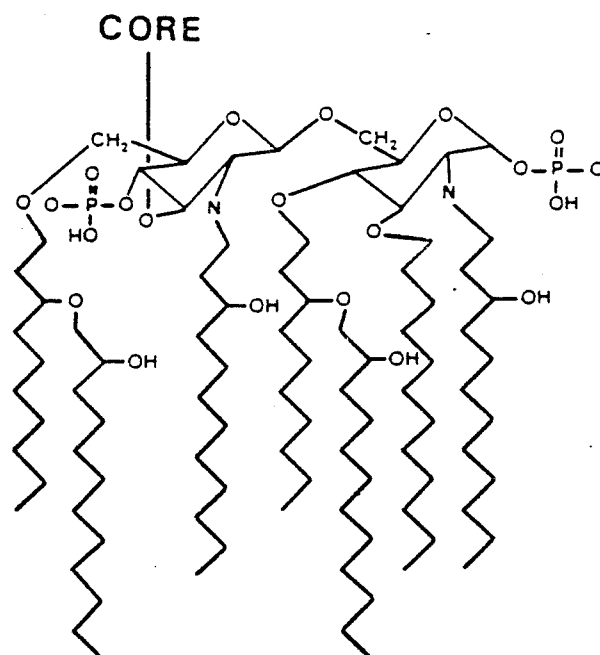


Figure 9 : Structure du Lipide A de *Pseudomonas aeruginosa* (D'après KROPINSKI et coll., 1985).

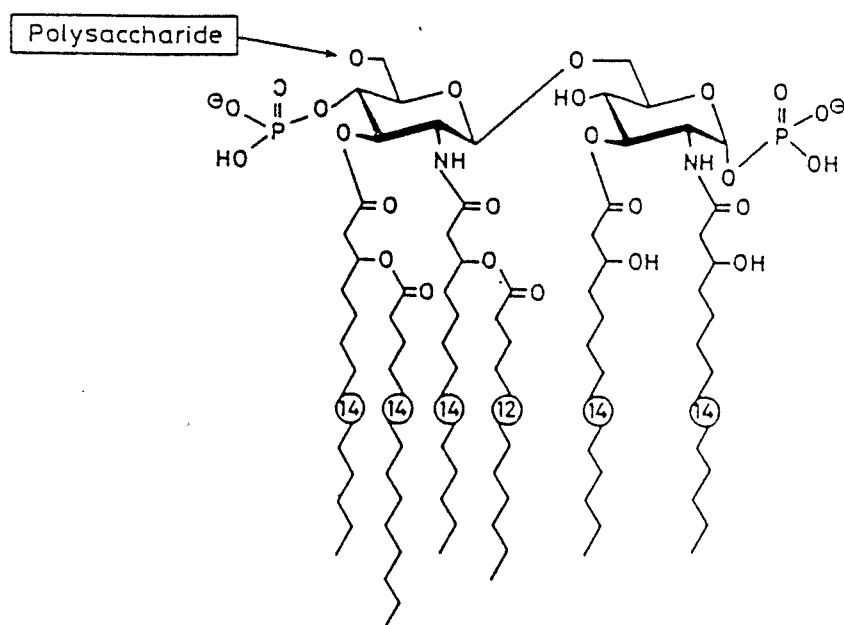


Figure 10 : Structure du Lipide A de *Escherichia coli* (D'après RIETSCHER et coll., 1988).

Les fonctions hydroxyle et amine des glucosamines sont substituées par des acides gras variables selon les espèces. On peut séparer les acides gras après hydrolyse acide et les étudier par chromatographie en phase gazeuse. Ces acides gras sont parfois β -hydroxylés. Une structure complète du lipide A de *Pseudomonas aeruginosa*, proposée par KROPINSKI est montrée par la Figure 9, [KROPINSKI et coll., 1985]. Depuis des travaux récents [RIETSCHER et coll., 1988] ont montré que chez les Entérobactéries et notamment chez *E. coli* le noyau polysaccharidique est fixé sur le carbone 6' d'une unité glucosamine du lipide A (cf Figure 10). Il est vraisemblable que cette observation est applicable aux LPS des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*.

Selon les genres bactériens, la principale différence au niveau du lipide A réside dans la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui substituent le dimère de glucosamine. Ils sont plus courts pour *Pseudomonas aeruginosa* que pour les Entérobactéries et cette remarque peut être généralisée à l'ensemble des *Pseudomonas*. L'acide gras β -hydroxylé typique des LPS des Entérobactéries est l'acide β -hydroxymyristique (ou acide β -hydroxytétradécanoïque C_{14:0} OH). Généralement chez les *Pseudomonas* celui-ci est remplacé par l'acide β -hydroxydodécanoïque [WILKINSON et coll., 1973; KROPINSKI et coll., 1985; FOMSGAARD, 1988; TANAMOTO, 1979].

D'autres acides gras hydroxylés peuvent également être observés selon les espèces, ceux-ci sont regroupés dans le Tableau 5 [WILKINSON et coll., 1973; WILKINSON, 1977a].

Chez *Pseudomonas aeruginosa* les groupements aminés sont substitués par l'acide 3-hydroxydodécanoïque, alors que les autres acides gras sont liés à la glucosamine par des liaisons ester ou sur les groupements hydroxyles des autres acides gras [PIER et coll., 1981, KROPINSKI et coll., 1985].

6-5-2 Le core ou noyau polysaccharidique

Dans une première étude, NAOI identifia le glucose, le rhamnose, la galactosamine et l'alanine comme des composants du core de la souche P1-III de *Pseudomonas aeruginosa* [NAOI et coll., 1958]. Ces observations ont été confirmées pour d'autres souches [FENSOM et coll., 1969; IKEDA et coll., 1973; FENSOM et coll., 1970; CHESTER et coll., 1973; WILKINSON et coll., 1975].

Bactéries	Acides Gras	
	Hydroxylés	Non Hydroxylés
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-OH-12:0 3-OH-12:0 3-OH-10:0	12:0, 16:0
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	3-OH-12:0 3-OH-10:0	12:0
<i>Pseudomonas diminuta</i>	3-OH-12:0 3-OH-13:0 3-OH-14:0	14:0
<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	3-OH-12:0 3-OH-14:0	12:0
<i>Pseudomonas rubescens</i>	3-OH-12:0 br 3-OH-13:0 3-OH-13:0	i-13:0, 13:0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3-OH-10:0 3-OH-12:0	12:0
<i>Pseudomonas syncyanea</i>	2-OH-12:0 3-OH-10:0 3-OH-12:0	12:0
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	2-OH i-11:0 2-OH-12:0 3-OH i-11:0 3-OH-12:0 3-OH i-13:0	nd
<i>Pseudomonas cepacia</i>	2-OH-16:0 3-OH-14:0 3-OH-16:0	nd
<i>Pseudomonas putida</i>] 2-OH-12:0 3-OH-10:0 3-OH-12:0	nd
<i>Pseudomonas acidovorans</i>		
<i>Pseudomonas aminovorans</i>		
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	3-OH-10:0	nd

Tableau 5: Acides gras hydroxylés et non hydroxylés observés dans les lipopolysaccharides de différentes espèces de *Pseudomonas*. (D'après WILKINSON et coll., 1973).

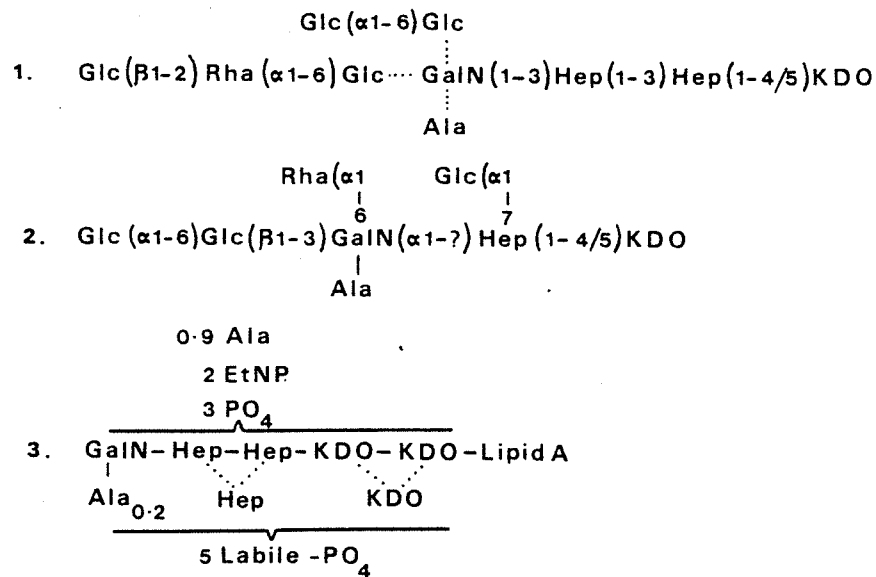


Figure 11 : Structure du core polysaccharidique de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 1999 (1), PAC1R (2) et PAO1 (3). Ala = Alanine, Hep = Heptose, KDO = 2-céto-3 désoxy-D-manno-octonique, GalN = Galactosamine, Glc = Glucose, Rha = Rhamnose. (D'après KROPINSKI et coll., 1985).

Species	Side-chain polysaccharide	Core polysaccharide
<i>P. diminuta</i>	Mannose	Glucose, Heptose, 2-Keto-3-deoxyoctonic acid
<i>P. pavonacea</i>	—	Glucose, Galactose, Aspartic acid, 2-Keto-3-deoxyoctonic acid
<i>P. rubescens</i> T	—	Glucose, Galactose, Heptose, Ethanolamine
<i>P. stutzeri</i>	Quinovosamine, Galactosamine	Rhamnose, Heptose, 2-Keto-3-deoxyoctonic acid, Glucose (?), Glucosamine, Galactosamine
<i>P. syncyanea</i>	Rhamnose, Ribose, Quinovosamine	Glucose, Heptose, 2-Keto-3-deoxyoctonic acid, Alanine, Glucosamine, Galactosamine

Figure 12: Composition en oses de la chaîne polysaccharidique et du core de différentes espèces de *Pseudomonas*. (D'après WILKINSON et coll., 1973).

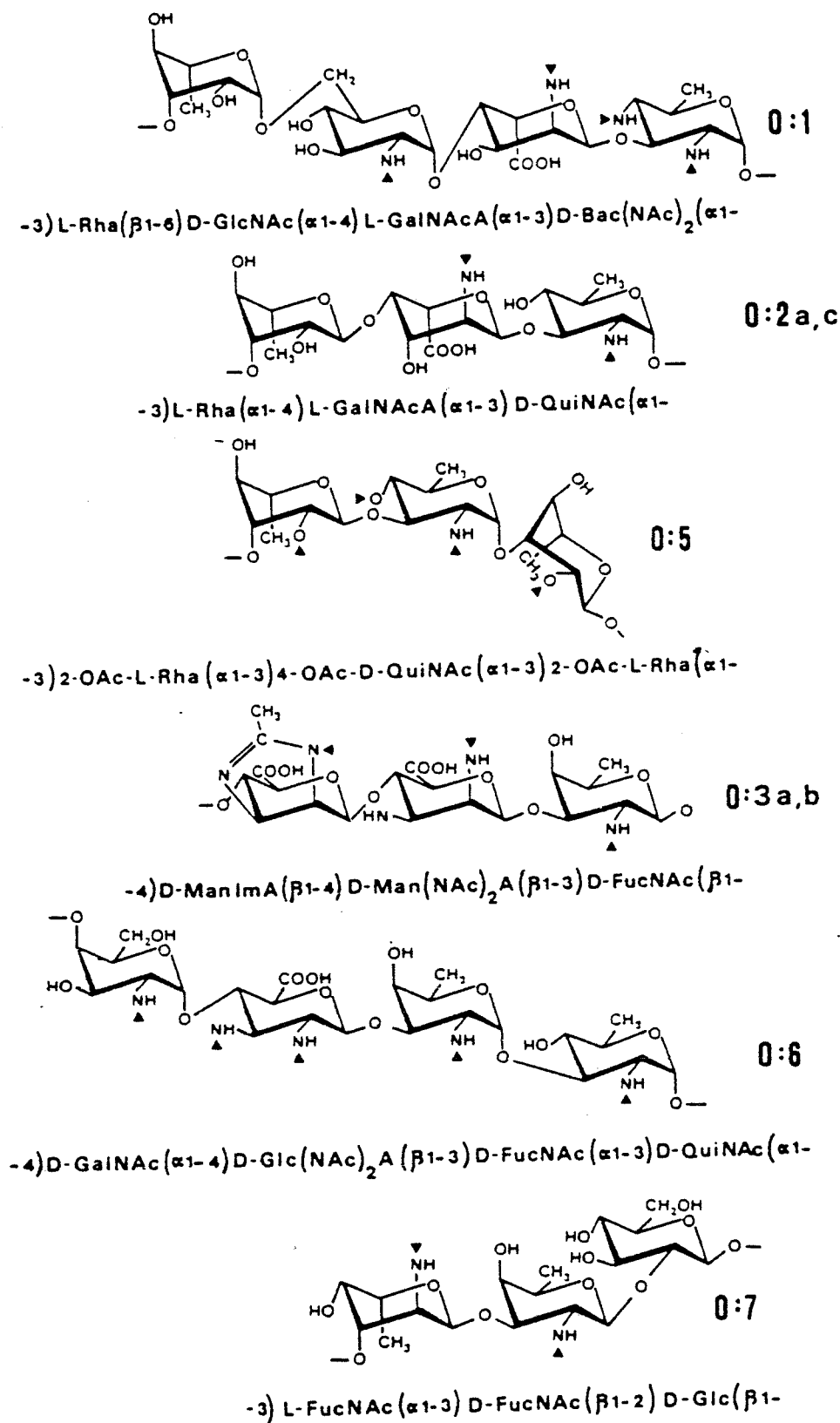


Figure 13: Structures des chaînes O-spécifiques de six sérotypes de *Pseudomonas aeruginosa*. (D'après KROPINSKI et coll., 1985).

L'ensemble de ces composés ainsi que le KDO, le phosphore et l'heptose semblent composer la région "core" du LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.

Une structure partielle a été proposée pour la souche NCTC 1999 (Figure 11) [DREWRY et coll., 1975], ainsi que pour deux souches proches sur le plan sérologique, PAC 1R [ROWE et coll., 1983] et PAO1 [KROPINSKI et coll., 1985] (cf. Figure 12).

L'heptose de la souche NCTC 1999 est le L-glycéro-D-manno-heptose [CHESTER et coll., 1972], toutefois celui-ci ne semble pas spécifique de cette espèce car une quantité similaire de D-glycéro-D-manno-heptose a été trouvée pour une autre souche [ADAMS et coll., 1967].

KROPINSKI suggère que la région du noyau polysaccharidique la plus proche du lipide A est très semblable entre les *Pseudomonas* et les Entérobactéries [KROPINSKI et coll., 1985].

WILKINSON rapporte la composition du noyau polysaccharidique d'autres espèces [WILKINSON et coll., 1973]. Ils ont en commun, le glucose, l'heptose, le phosphore et le KDO (Figure 12) à l'exception de *Pseudomonas rubescens* qui ne possède pas de KDO détectable par le test de dosage par l'acide thiobarbiturique.

Des divergences existent entre WILKINSON et HORTON quant à la présence ou à l'absence de résidus triphosphates au niveau du core de *Pseudomonas aeruginosa*. [WILKINSON, 1981b; HORTON et coll., 1981].

6-5-3 La chaîne polysaccharidique O-spécifique

La chaîne O-spécifique constitue l'antigène somatique O, elle est responsable de la spécificité sérologique des LPS. Sa composition chimique est très variable selon les souches.

La structure de base de la chaîne polysaccharidique est une molécule oligosaccharidique appelée sous-unité répétitive. Le rhamnose est le sucre neutre le plus fréquent chez les *Pseudomonas* [FENSOM et coll., 1970; CHESTER et coll., 1973, WILKINSON et coll., 1975, DRIGUES et coll., 1985]. L'arabinose, le mannose et le xylose entrent également dans la composition des chaînes O-spécifiques des LPS de certaines souches de *Pseudomonas* [NAOI et coll., 1958; FENSOM et coll., 1970; HANESSIAN et coll., 1971; CHESTER et coll., 1973; MLYNARCIK et coll., 1974; WILKINSON et coll., 1975].

L'étude de la composition de cette sous-unité est délicate. En effet certains sucres qui la composent sont spécifiques des LPS et il n'existe pas de standards commerciaux permettant leur identification rapide et fiable.

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les sous-unités sont des tri- ou des tétrasaccharides riches en sucres aminés, incluant de nombreux dérivés de glucosamine, galactosamine, fucosamine et quinovosamine [FENSOM et coll., 1969; SUZUKI, 1969; BARROW et coll., 1972; IKEDA et coll., 1973; PERRY et coll., 1974; SUZUKI, 1974; KOVAL et coll., 1975]. Ces chaînes oligosaccharidiques sont non ramifiées [DMITRIEV et coll., 1980,1982; KNIREL et coll., 1982, 1985a,b, 1986, 1987a,b,c; KROPINSKI et coll., 1985; TAHARA et coll., 1983, YOKOTA et coll., 1986, 1988] à l'exception de la souche V (IM-s Verder-Evans) qui présente une ramification [KNIREL et coll., 1987c].

Sur les 13 sérogroupes proposés par HOMMA, six sous-unités ont été initialement déterminées (Figure 13) [HOMMA, 1982].

De nombreuses études portant sur la structure de l'entité oligosaccharidique de divers sérogroupes de *Pseudomonas aeruginosa* ont permis d'identifier certains sucres inhabituels. Une liste non exhaustive est donnée dans le Tableau 6.

7 - FONCTIONS BIOLOGIQUES DES ENDOTOXINES

Les endotoxines sont capables de provoquer de nombreuses réactions biologiques chez un hôte. Ces réactions sont les mêmes pour toutes les endotoxines indépendamment de la souche bactérienne dont elles proviennent.

Les LPS des formes R et S présentent les mêmes activités biologiques. L'ensemble de ces observations semble indiquer que la fraction biologiquement active des LPS est le lipide A associé ou non au core. En effet le lipide A et le core sont les deux régions les plus constantes des LPS.

Les différentes activités biologiques attribuées aux composants des LPS ou du lipide A sont présentées dans la Figure 14.

Certaines activités des endotoxines peuvent être évaluées par différents tests biologiques. Nous allons décrire les plus répandus.

Activités biologiques dues aux composants du LPS ou du Lipide A

Pyrogénicité	Induction de la résistance non spécifique à l'infection
Toxicité létale chez la souris	Induction de la tolérance à l'endotoxine
Leucopénie	Induction d'un état réfractaire aux changements de température
Leukocytose	Activité adjuvante
Réaction locale de Shwartzman	Rôle mitogène sur les cellules
Nécrose de la moelle osseuse	Rôle nécrogène sur les tumeurs
Résorption du squelette embryonnaire	Activations des macrophages (Synthèse d'Interleukine 1).
Activation du complément	Induction du facteur de croissance bactérien
Diminution de la tension artérielle	Induction de la synthèse d'IgG chez les souris nouveau-nées
Aggrégation des plaquettes	Induction de la synthèse de prostaglandines
Activation du facteur d'Hageman	Induction de la production d'interféron
Induction de l'activateur du plasminogène	Induction du facteur de nécrose des tumeurs
Gélification d'un lysat d'amœbocytes de Limule	Induction de la pyruvate kinase du foie de souris
Toxicité augmentée par le BCG	Sécrétion de RNA viral de type C par les cellules spléniques de souris
Toxicité augmentée par l'adrénalectomie	Action positive sur la formation dans la rate de souris d'un foyer viral de Friend
Augmentation de la réactivité dermique à l'épinéphrine	Inhibition de la phosphoenolpyruvate carboxykinase
	Hypothermie des souris

Figure 14 : Principales activités biologiques des lipopolysaccharides ou du Lipide A

REMARQUE À PROPOS DU TEST SUR LAPIN

Le "test sur lapin" est le test officiel de la Pharmacopée Française (X^{ème} édition) pour la recherche de substances pyrogènes dans les solutés injectables, dans les dérivés du sang ainsi que dans tout médicament contenant cette clause dans leur Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Ce test demande une infrastructure importante et des conditions de réalisation très strictes. Il est basé sur l'élévation de la température corporelle du lapin après injection des échantillons dans la veine marginale de l'oreille.

Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas utilisé ce test au cours de notre étude. Il s'agit de plus, d'un test qualitatif et non quantitatif.

7-1 LE TEST L.A.L. (LYSAT D'AMÉBOCYTES DE LIMULE)

L'utilisation du lysat d'améboocytes de Limule (LAL) pour la détection des endotoxines est due à BANG [BANG, 1956]. Il observa que l'infection du crabe primitif : *Limulus polyphemus* (crabe en fer à cheval) par des bactéries à Gram négatif provoquait une coagulation intra-vasculaire de son hémolymphe qui conduisait à la mort de l'animal.

LEVIN et BANG montrèrent que ce phénomène provenait de la réaction entre les endotoxines (d'*Escherichia coli* et de *Vibrio cholerae*) et un lysat d'améboocytes représentant les seuls éléments figurés présents dans l'hémolymphe de la Limule [LEVIN et coll., 1964a; LEVIN et coll., 1964b]. Ils développèrent une méthode sensible de détection des endotoxines basée sur la coagulation de ce lysat cellulaire [LEVIN et coll., 1968].

SOLUM [SOLUM, 1970; SOLUM, 1973] et YOUNG [YOUNG et coll., 1972] ont purifié et caractérisé la protéine coagulante du LAL. TAI a montré que la réaction du LAL avec les endotoxines était de type enzymatique et qu'elle était dépendante d'ions magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}) [TAI et coll., 1977].

De nombreux travaux ont permis d'élucider la séquence des réactions enzymatiques impliquées dans la formation du gel (Figure 15). La coupure de la molécule de coagulogène par l'enzyme activée conduit à la libération de coaguline qui compose le gel. Cette technique est utilisée actuellement pour la détermination semi-quantitative des endotoxines. En effet, un dosage précis n'est pas envisageable car la prise du caillot n'est pas toujours facile à estimer à l'œil nu. Il existe néanmoins des méthodologies turbidimétriques, basées sur la cinétique de la réaction de gélification, qui sont très précises, mais très délicates à maîtriser.

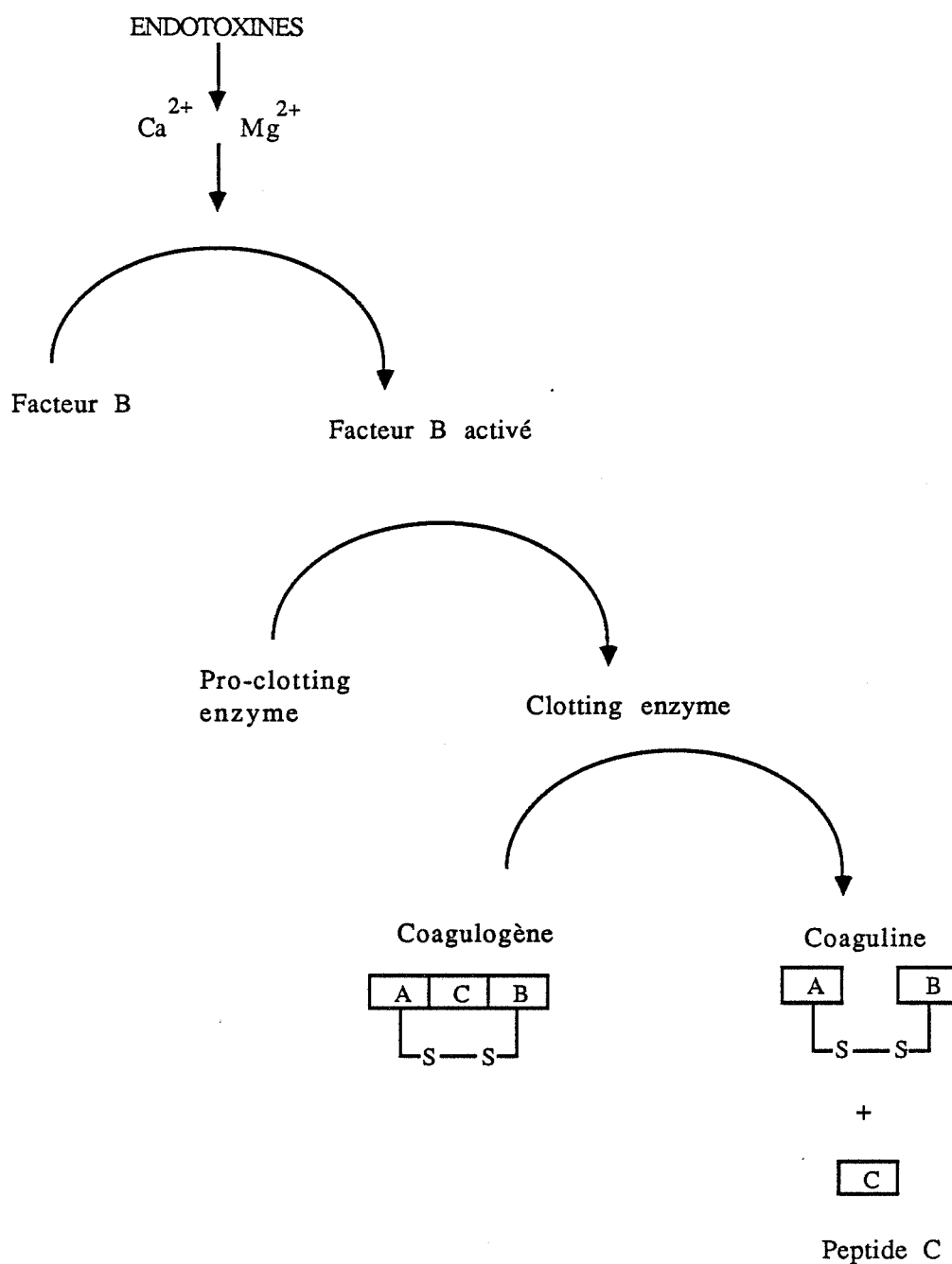


Figure 15 : Représentation schématique du système de coagulation du LAL. Le facteur B est activé par la présence d'endotoxine, il active à son tour la "pro-clotting enzyme" qui libère le peptide C du coagulogène en donnant la coaguline qui compose le gel.

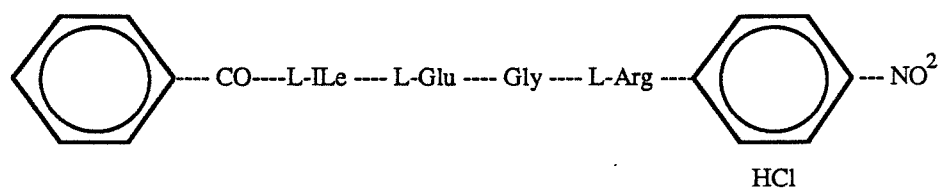


Figure 16 : Structure typique du substrat synthétique utilisé dans le test LAL chromogénique. La clotting enzyme formée catalyse l'hydrolyse du groupement p-Nitroaniline (pNa). La quantité de pNa libéré est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm.

Il a été démontré que, après activation, l'enzyme terminale pouvait hydrolyser d'autres molécules et notamment des substrats chromogènes synthétiques. Cette réaction conduit à la libération d'un produit coloré : le para-nitroaniline (pNa) permettant une mesure spectrophotométrique à 405 nm (Figure 16).

De nouveaux tests permettant de passer de la méthode de détection de l'activation enzymatique par formation de caillot à celle utilisant la libération de pNa, ont été élaborés [IWANAGA, 1978; FRIBERGER, 1982]. La coloration développée étant proportionnelle à la quantité d'endotoxine présente, ces tests autorisent une évaluation quantitative de l'activité LAL des échantillons à doser.

7-2 CAPACITÉ D'INDUCTION DE LA SYNTHÈSE D'INTERLEUKINE-1 (IL-1)

Parmi les nombreuses activités biologiques attribuées aux LPS, nous avons également retenu leur capacité à induire la synthèse et la sécrétion d'interleukine-1 (IL-1) par des monocytes humains in-vitro [NEWTON, 1986]

7-2-1 - Présentation de l'interleukine-1 humaine

L'interleukine-1 est une protéine de poids moléculaire 17,5 Kda. On distingue l'IL-1 α de l'IL-1 β sur la base de leur composition en amino-acides et de leurs points isoélectriques, qui sont respectivement de 5,0 et de 7,0.

Cette molécule est biologiquement active à de très faibles concentrations (inférieures à 10^{-10} M) et possède un spectre d'activité très large.

7-2-2 - Induction de la synthèse d'interleukine-1

De nombreux stimuli peuvent être à l'origine de la production d'interleukine-1. Le LPS est l'un des meilleurs [LACHMAN 1983; DINARELLO, 1988]. Les nombreuses activités biologiques attribuées aux LPS découlent en fait de leur capacité à induire la production d'IL-1 mais également de TNF, d'IFN γ , de PGE₂ de CSF et de leucotriènes.

AREND [AREND et coll., 1986] a développé un test qui permet d'évaluer la synthèse et la sécrétion d'IL-1 par des monocytes humains, en réponse à une stimulation par les LPS. Ce test est détaillé dans la partie Matériels et Méthodes de ce travail.

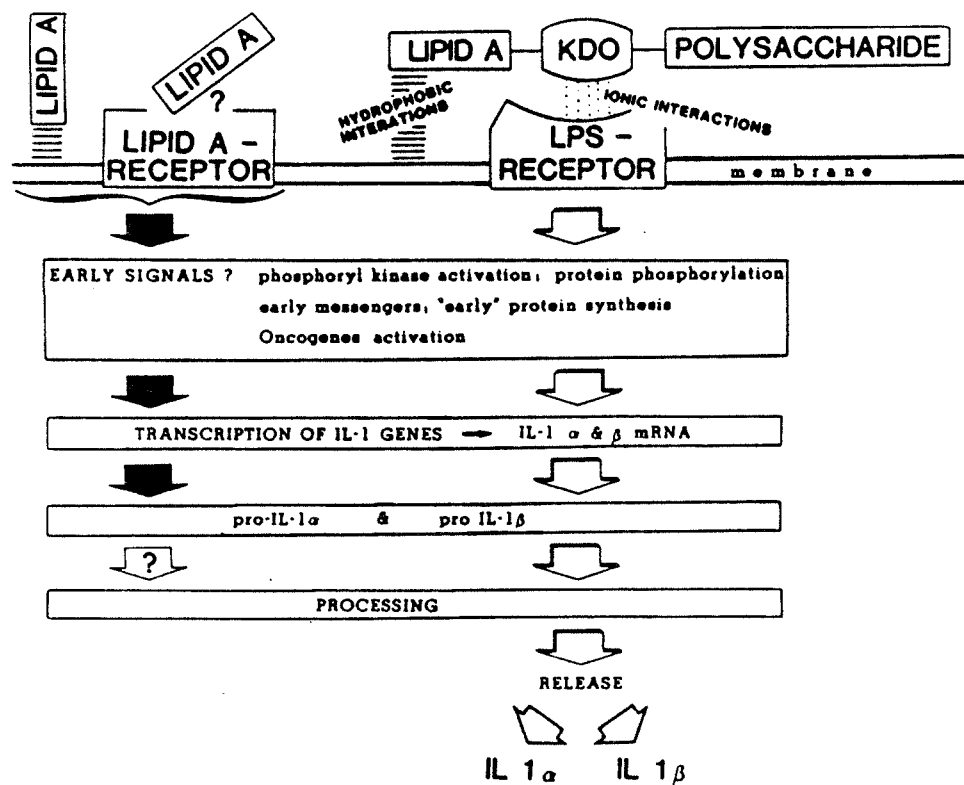


Figure 17 : Modèle hypothétique de l'induction de la production d'Interleukine-1 (IL-1) par les Lipopolysaccharides, ou le Lipide A, après interaction avec la membrane du macrophage. (D'après HAEFFNER-CAVAILLON et coll., 1986).

Les doses de LPS, l'origine de ceux-ci, la nature des cellules ainsi que leur réponse individuelle sont autant de paramètres qui influencent l'amplitude de la production d'IL-1 [NEWTON 1986]. Même si le lipide A joue un rôle important dans la stimulation des monocytes, LEBBAR a montré que la sécrétion d'IL-1 par des monocytes humains nécessite une interaction entre le LPS via sa portion polysaccharidique et la membrane du monocyte. Il semble que ce soit plus précisément la partie "core" contenant des sucres particuliers comme le KDO et les heptoses qui interviennent de manière spécifique dans cette interaction [LEBBAR et coll, 1987].

L'ensemble de ces remarques a conduit HAEFFNER-CAVAILLON à proposer le schéma hypothétique présenté Figure 17 afin d'expliquer l'induction par le LPS de la synthèse et de la libération d'IL-1 par les monocytes [HAEFFNER-CAVAILLON et coll, 1986].

8-TEST DE PERMÉABILITÉ DE LA MEMBRANE D'HÉMODIALYSE AUX ENDOTOXINES BACTÉRIENNES.

Dans une première étude de BERNICK, utilisant un montage simple et des infusions de bactéries précédemment isolées dans les circuits d'eau de dialyse, aucun transfert d'endotoxines natives n'a pu être détecté à travers différents types de membrane d'hémodialyse à l'aide du test LAL [BERNICK et coll., 1979].

Les progrès apportés dans la fabrication des membranes avec notamment l'émergence des membranes à haut-flux beaucoup plus perméables à l'eau, ont conduit KLINKMANN à comparer la perméabilité de deux types de membranes vis-à-vis des LPS [KLINKMANN et coll., 1985]. Il a utilisé d'une part, des membranes en cellulose régénérée, qui sont peu perméables, et d'autre part des membranes à haut flux en polysulfone (cf Figure 2). Ces tests ont été réalisés avec des LPS commerciaux d'*Escherichia coli* 026:B6 (Sigma, St-Louis Mo). L'évaluation de l'activité biologique de l'ultrafiltrat a été estimée par le test LAL.

Les résultats indiquent qu'à pression trans-membranaire identique, la membrane en cellulose régénérée est imperméable aux LPS, ou tout du moins à des composés réagissant avec le LAL, contrairement à la membrane en polysulfone qui, elle, est perméable.

Toutefois, ces résultats sont critiquables dans la mesure où les débits d'ultrafiltration de ces deux membranes, pour une même pression, sont très différents.

En effet la membrane en polysulfone étant beaucoup plus perméable à l'eau, elle autorise un transfert de liquide beaucoup plus important.

En 1987, BOMMER montre que divers LPS ou lipide A sont incapables de traverser la membrane de dialyse en polysulfone. Les évaluations d'activité biologique ont également été réalisées avec le test LAL [BOMMER et coll., 1987b].

En 1987, LONNEMANN montre au cours d'une simulation de dialyse *in vitro* que le relargage d'IL-1 circulante dans le compartiment sang est observé lorsque le liquide circulant dans le compartiment bain est contaminé par des endotoxines natives. Cette expérience a été réalisée avec une membrane de type Cuprophane® [LONNEMANN et coll., 1987].

Aucune expérience ne permet de démontrer clairement le passage de dérivés bactériens, et plus particulièrement de LPS à travers les membranes de dialyse. Le fait d'utiliser des tests d'évaluation de l'activité biologique différents ne facilite pas les interprétations d'une expérience à l'autre. En effet, le test LAL fait appel à une fonction biologique des LPS de type moléculaire, alors que le test IL-1 fait appel à une fonction biologique de type cellulaire. Ces deux tests sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes de ce travail. Nous nous proposons au cours de ce travail de montrer, par une approche différente, l'existence d'un transfert réel de LPS provenant de bactéries isolées de circuits de dialyse, à travers les membranes de dialyse.

MATERIELS ET METHODES
MATERIELS ET METHODES
MATERIELS ET METHODES

1 - ISOLEMENT DES BACTÉRIES

L'étude de la contamination bactérienne des dialysats a été réalisée en différents points du circuit de dialyse. Des prélèvements ont été effectués tout d'abord dans les bains concentrés servant de solution mère pour la génération du dialysat, en provenance de différents fabricants européens. D'autres ont été faits au niveau du moniteur de dialyse après dilution du concentré, enfin certains prélèvements ont été réalisés dans les circuits de production d'eau purifiée des centres de dialyse.

100 µl de dilutions logarithmiques des différents échantillons prélevés stérilement, sont étalés à la surface d'une boîte de Gélose Trypcase-soja (GTS, Biomérieux) dont la composition est la suivante :

- Bio-trypcase.....	15 g
- Bio-soyase.....	5 g
- NaCl.....	5 g
- Gélose.....	15 g

pH = 7,3.

Il s'agit d'un milieu de culture très courant, qui contient deux types de peptones et autorise la culture d'une grande variété de germes aérobies et anaérobies, y compris les germes exigeants.

Les boîtes sont incubées 48h à + 30°C / + 32°C.

Les colonies isolées sont ensuite repiquées sur milieu neuf avant d'effectuer l'identification.

2 - IDENTIFICATION

Après une observation macroscopique de l'aspect des colonies on procède à l'identification .

2-1 OBSERVATION VITALE :

Un montage entre lame et lamelle permet d'apprécier la forme générale des bactéries ainsi que leur mobilité éventuelle.

2-2 COLORATION DE GRAM.

Les bactéries sont déposées sur lame de verre et séchées, elles sont ensuite fixées par la chaleur, puis colorées par une solution de violet de gentiane, le mordantage étant réalisé par le Lugol.

La décoloration éventuelle est réalisée par un mélange alcool / acétone (1:1) et on réalise une contre-coloration par une solution de safranine. Les bactéries de type Gram positif apparaissent en bleu / violet, celles de type Gram négatif apparaissent en rouge.

2-3 GALERIES D'IDENTIFICATION

L'identification des germes repose sur la détermination de leur biotype, c'est-à-dire des voies métaboliques dont dispose la bactérie. Nous avons utilisé pour cela des galeries API de type 20NE (API système SA France) car les 20 tests qu'elles comportent (8 conventionnels et 12 d'assimilation) permettent une discrimination assez fine des bactéries n'appartenant pas à la famille des Entérobactéries. Les résultats sont interprétés à l'aide de la base de donnée API 20NE. Lorsque cela s'est avéré nécessaire, des tests complémentaires, comme par exemple la croissance à + 40°C, ont été réalisés pour une discrimination complète.

Après repiquage et contrôle de pureté, les souches sont conservées à + 4°C sur milieu de conservation (Institut Pasteur Production, France).

2-4 CHOIX DES SOUCHES POUR L'ÉTUDE DES LPS

Parmi l'ensemble des bactéries isolées nous avons retenu deux souches typiques des espèces appartenant au genre *Pseudomonas* retrouvées le plus fréquemment : *cepacia* et *testosteroni* (cf chapitre Résultats).

3 - CULTURE DES BACTÉRIES

A partir d'un milieu de conservation, on ensemence un tube de Bouillon Trypcase-soja (BTS, Biomérieux) de composition suivante :

- Bio-trypcase.....	17 g
- Bio-soyase.....	3 g
- NaCl.....	5 g
- K ₂ HPO ₄	2,5 g
- Glucose.....	2,5 g

pH = 7,3

Cette préculture est incubée durant 24h à + 32°C. Ce tube sert d'inoculum pour un erlenmeyer contenant 100 ml de bouillon qui est incubé dans les mêmes conditions. Nous ensemençons ensuite un fermenteur (Biolaffite) contenant 1,3 litre de milieu dans les conditions suivantes:

- agitation 400 rpm,
- température + 32°C,
- aération 7,5 l.l⁻¹.h⁻¹.

Après 24h, le contenu du fermenteur Biolaffite sert d'inoculum pour une culture dans un fermenteur (Chemap) contenant 10 l de BTS. Les conditions de culture sont les suivantes :

- agitation 400 rpm,
- température + 32°C,
- aération 7,5 l.l⁻¹.h⁻¹.

Des prélèvements sont effectués régulièrement et la croissance est estimée par deux techniques de numération directes : la turbidimétrie d'une part (mesure de la D.O à 540 nm) et par le dénombrement des germes viables après étalement sur boîtes de GTS d'autre part.

La récolte des bactéries se fait en fin de phase exponentielle; les cellules sont concentrées par filtration tangentielle puis rincées en NaCl 9 ‰. Lorsque le volume n'est plus que d'un litre, les bactéries sont lavées par centrifugation 5000 g/20 min en NaCl 9 ‰, un dernier lavage étant effectué en H₂O PPI.

Les culots sont recueillis dans un flacon taré puis lyophilisé.

4 - EXTRACTION DES LPS

4-1 EXTRACTION P.C.P. [GALANOS et coll., 1969]

4-1-1 Préparation du mélange

Le mélange d'extraction utilisé est composé de 90 g de phénol additionné de 11 ml d'eau, de chloroforme et d'éther de pétrole dans un rapport (2:5:8).

4-1-2 Extraction

Les bactéries lyophilisées sont mises en suspension dans le mélange d'extraction (10 g de bactéries pour 100 ml de mélange). La suspension est homogénéisée à l'Ultra-Turrax pendant 2 minutes dans le but d'améliorer la dispersion.

Les bactéries sont ensuite séparées du surnageant contenant les LPS, par centrifugation à 10.000 rpm durant 15 minutes (Centrifugeuse Beckman modèle J-21, rotor JA-20). L'extraction est répétée 3 fois; les surnageants sont réunis après filtration sur papier filtre. Les culots bactériens sont conservés afin de subir l'extraction par le phénol aqueux à chaud.

L'éther de pétrole et le chloroforme sont éliminés par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite afin de ne conserver que le phénol.

De l'eau est ensuite ajoutée goutte à goutte dans le phénol jusqu'à floculation des LPS; on laisse flocculer au moins 1 heure. Les LPS sont recueillis par centrifugation 15 min à 10.000 rpm, le phénol est éliminé par centrifugation. Les culots sont lavés deux fois avec du phénol à 80 % puis 3 fois avec de l'acétone, enfin un dernier lavage est effectué avec de l'éther. Après évaporation de l'éther résiduel, on pèse les LPS bruts.

4-1-3 Ultracentrifugation

Les LPS sont remis en suspension dans de l'eau PPI à raison de 50 ml pour 1g. Le mélange est maintenu sous agitation à + 4°C durant une nuit, puis ultracentrifugé à 105.000 g pendant 4h à +10°C (Ultracentrifugeuse Beckman L5-50B, rotor Ti 50). Les surnageants sont prélevés délicatement, et les culots translucides restants représentent les LPS I. Ceux-ci sont repris par H₂O PPI puis lyophilisés et pesés.

Les culots de résidus bactériens issus de cette extraction sont lavés 3 fois par l'acétone puis une fois à l'éther et mis à sécher. Ils sont prêts à subir la seconde extraction.

4-2 EXTRACTION PAR LE PHÉNOL AQUEUX À + 68°C [WESTPHAL et coll., 1952]

Les bactéries utilisées pour cette extraction se présentent soit sous forme lyophilisée, soit sous la forme de résidus secs issus de l'extraction P.C.P.

4-2-1 Extraction

Dans un premier temps les bactéries sont resuspendues dans de l'eau distillée (10 g de bactéries pour 175 ml) et placées au bain-marie à + 68°C. Dans un second temps, un même volume de phénol aqueux, incubé à + 68°C, est additionné à la suspension bactérienne; l'ensemble est maintenu à cette température sous constante agitation durant 5 minutes. Le mélange est ensuite refroidi rapidement dans la glace jusqu'à la température de + 10°C. Le mélange est alors centrifugé à 10.000 rpm durant 30 min à + 10°C (centrifugeuse Beckman J-21, rotor JA 20) et l'on recueille la phase supérieure (phase aqueuse) contenant les LPS. L'extraction est répétée une nouvelle fois en ajoutant 175 ml d'eau à + 68°C à la phase phénolique résiduelle.

4-2-2 Dialyse

L'ensemble des phases aqueuses est dialysé durant 4 jours contre l'eau courante et deux jours contre l'eau distillée afin d'éliminer le phénol. Une centrifugation à basse vitesse (5.000 rpm, 15 min) permet d'éliminer les résidus éventuels. Le surnageant est lyophilisé et pesé.

4-2-3 Action des nucléases

Le produit de la lyophilisation est repris dans du tampon Tris - HCl 0,05M, pH = 7 à raison de 50 ml pour 10 g de bactéries sèches. Les acides nucléiques sont éliminés par addition de ribonucléase (2 mg Boehringer) et de désoxyribonucléase (2 mg DNase I Boehringer). Le mélange est agité une nuit à + 37°C puis dialysé 24h à 48h contre de l'eau distillée et centrifugé à 5.000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est lyophilisé et pesé.

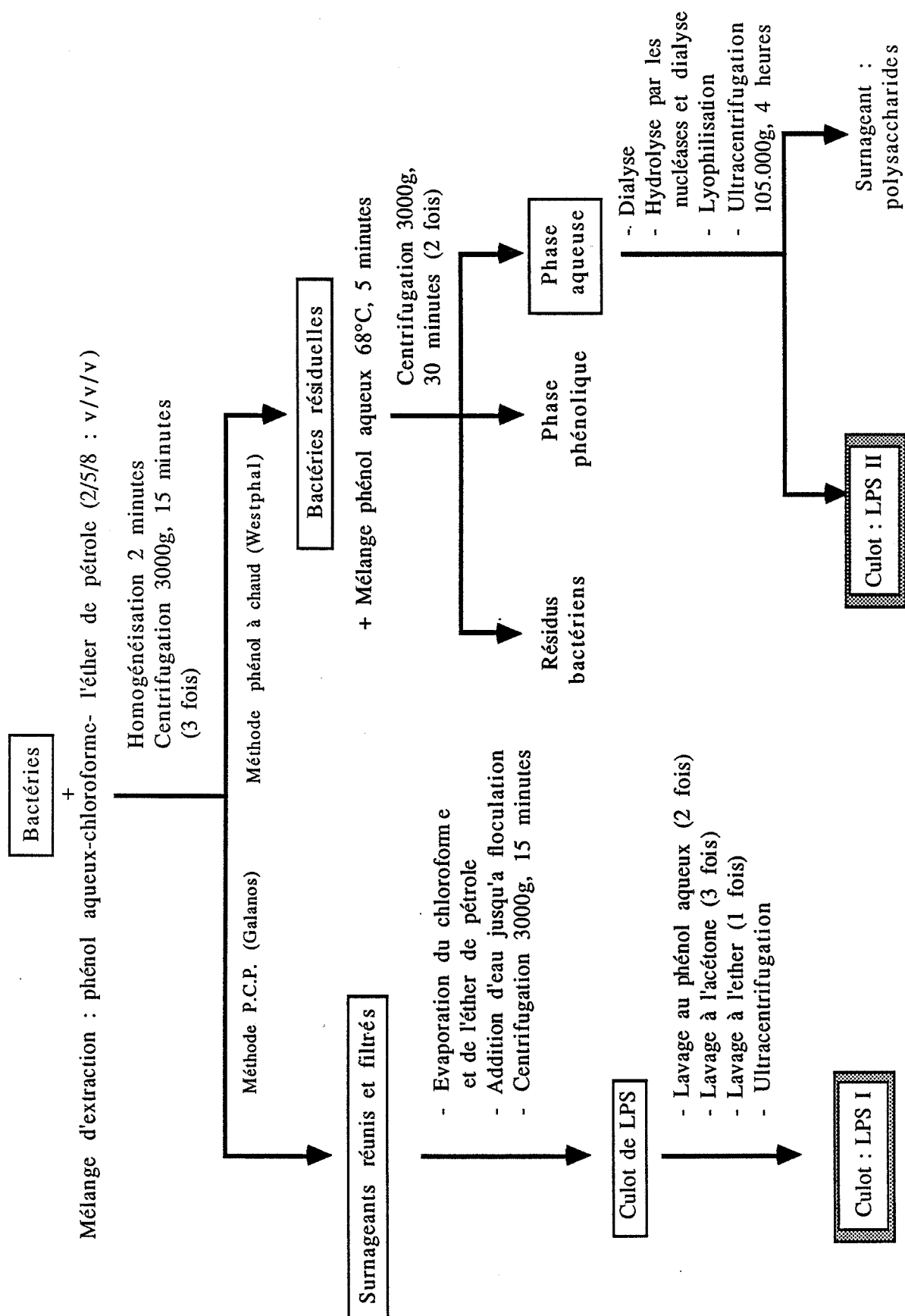


Figure 18 : Extraction des Lipopolysaccharides (LPS I et LPS II)

4-2-4 Ultracentrifugation

On reprend 0,5 g du lyophilisat précédent (LPS II bruts), par 50 ml d'H₂O distillée. La suspension est agitée à + 4°C pendant une nuit puis centrifugée à 105 000 g durant 4h à + 10°C. (Ultracentrifugeuse Beckman L5-50B, rotor Ti 50). Les culots sont repris par de l'eau distillée, lyophilisés et pesés.

A ce stade on possède les LPS II.

La Figure 18 résume l'ensemble des techniques d'extractions.

5 - ANALYSE DES LPS PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les LPS sont des molécules chargées négativement et peuvent donc migrer sous l'action d'un champ électrique. Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide décrite par LAEMMLI [LAEMMLI, 1970] modifiée par KOMURO [KOMURO et coll., 1988] et adaptée dans notre laboratoire.

5-1 CONDITIONS D'ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de séparation de dimension : L = 10 cm x l = 8 cm x e = 0,075 cm et de composition suivante :

Gel de séparation:

- Acryl-Bisacrylamide (52,5 : 1).....	10 ml
- Urée 12M.....	12 ml
- Tris-HCl 1,5M pH = 8,4, DOC 0,25%.....	7,5 ml
- Persulfate d'ammonium 10 %.....	200 µl
- Temed.....	20 µl

Tampon d'électrophorèse

- Tris-HCl pH = 6,8	25 mM
- Glycine.....	200 mM
- SDS	0,1 %
- H ₂ O distillée qsp.....	1 l

Tampon dénaturant

- Tris - HCl pH = 6,8.....	100 mM
- Sucrose	2 %
- SDS	2 %
- Bleu de Bromophénol.....	0,1 %

Pour les LPS, l'emploi d'un gel de concentration n'apporte pas d'amélioration quant à la résolution de la séparation. Nous ne l'avons donc pas utilisé.

Les échantillons lyophilisés sont repris directement dans le tampon dénaturant; ceux en solution sont dilués au 1/2 dans un tampon dénaturant deux fois concentré.

La migration est effectuée à courant constant (25 mA / gel) durant 2 heures environ jusqu'à ce que l'indicateur coloré ait atteint le bas du gel.

5-2 COLORATION AU NITRATE D'ARGENT [TSAI et coll., 1982]

Après migration les gels sont fixés et colorés selon la technique décrite par TSAI et FRASCH. Les gels sont déposés dans des boîtes de coloration nettoyées au préalable par HNO_3 pur et rincées par H_2O . Toutes les étapes de la coloration se font sous agitation.

5-2-1 Fixation

- Ethanol.....	400 ml
- Acide acétique.....	50 ml
- H_2O qsp	1 l

Les gels sont fixés pendant une nuit sous agitation.

5-2-2 Oxydation

- Acide periodique.....	3,5 g
- H_2O qsp	1 l

Le fixateur est remplacé par le mélange oxydant et les gels sont maintenus 5 min précisément sous agitation (40 rpm). L'oxydation est suivie de cinq rinçages de 15 min en H₂O distillée.

5-2-3 Coloration par le nitrate d'argent

- Ammoniaque concentrée.....	2 ml
- NaOH 0,1N.....	28 ml
- AgNO ₃ à 20 % dans H ₂ O	5 ml
- H ₂ O distillée.....	115 ml

Ce réactif est préparé extemporanément, les gels y sont maintenus durant précisément 10 min sous agitation constante (70 rpm).

Cette étape est suivie de cinq rinçages de 15 minutes en H₂O distillée.

5-2-4 Révélation

- Acide citrique.....	50 mg
- Formaldéhyde 37 %.....	0,5 ml
- H ₂ O distillée qsp.....	1 l

Durée : 2 minutes précisément puis le révélateur est remplacé par de l'eau distillée et on laisse la révélation se développer pendant 1 heure.

6 - ANALYSE DES LPS PAR CHROMATOGRAPHIE FPLC® ET PAR ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE.

6-1 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION FPLC®

Une colonne de gel filtration FPLC Superose 12 (Pharmacia) est connectée à une pompe HPLC Gilson (modèle 302) munie d'une tête 10 WSC.

L'échantillon est injecté grâce à une vanne Rhéodyne (modèle 7125). La densité optique de l'éluant est mesurée à 260 nm par un spectrophotomètre P.U. 4020 (Philips) relié à un enregistreur.

Le système est équilibré avec le tampon décrit par PETERSON [PETERSON et coll., 1985] :

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM
- NaCl..... 200 mM
- Déoxycholate de sodium..... 6 mM
- NaN₃..... 0,02 %

Le pH est ajusté à 8,0 avec HCl.

Le débit de la phase mobile est de 200 $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$.

Les LPS sont repris dans le tampon d'élution à la concentration de 10 mg/ml. Ils sont homogénéisés par sonication à l'aide d'une microsonde reliée à un générateur BRANSON (500 Watt) réglé à la puissance 4 durant 1 min afin de favoriser la dispersion des LPS.

100 μl d'échantillon sont injectés en tête de colonne; le volume des fractions collectées est de 1 ml. Les fractions sont testées en électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide.

Cette technique possède une résolution qui permet de séparer partiellement les LPS de formes R des LPS de forme S, de plus cette séparation dépend en grande partie de la provenance du LPS.

Nous avons mis au point une technique d'analyse plus résolutive : l'électrophorèse électroendosmotique qui nous permet de séparer toutes les formes de LPS.

6 - 2 ANALYSE DES LPS PAR ÉLECTROPHORÈSE ÉLECTROENDOSMOTIQUE PRÉPARATIVE (ELFE®, GENOFIT)

Principe :

L'électroendosmose met en jeu le flux de tampon qui apparaît entre les deux électrodes durant une électrophorèse. Ce phénomène est utilisé par l'appareil ELFE® pour éluer les fractions sortant du gel après séparation en fonction de leur masse moléculaire (Figure 19).

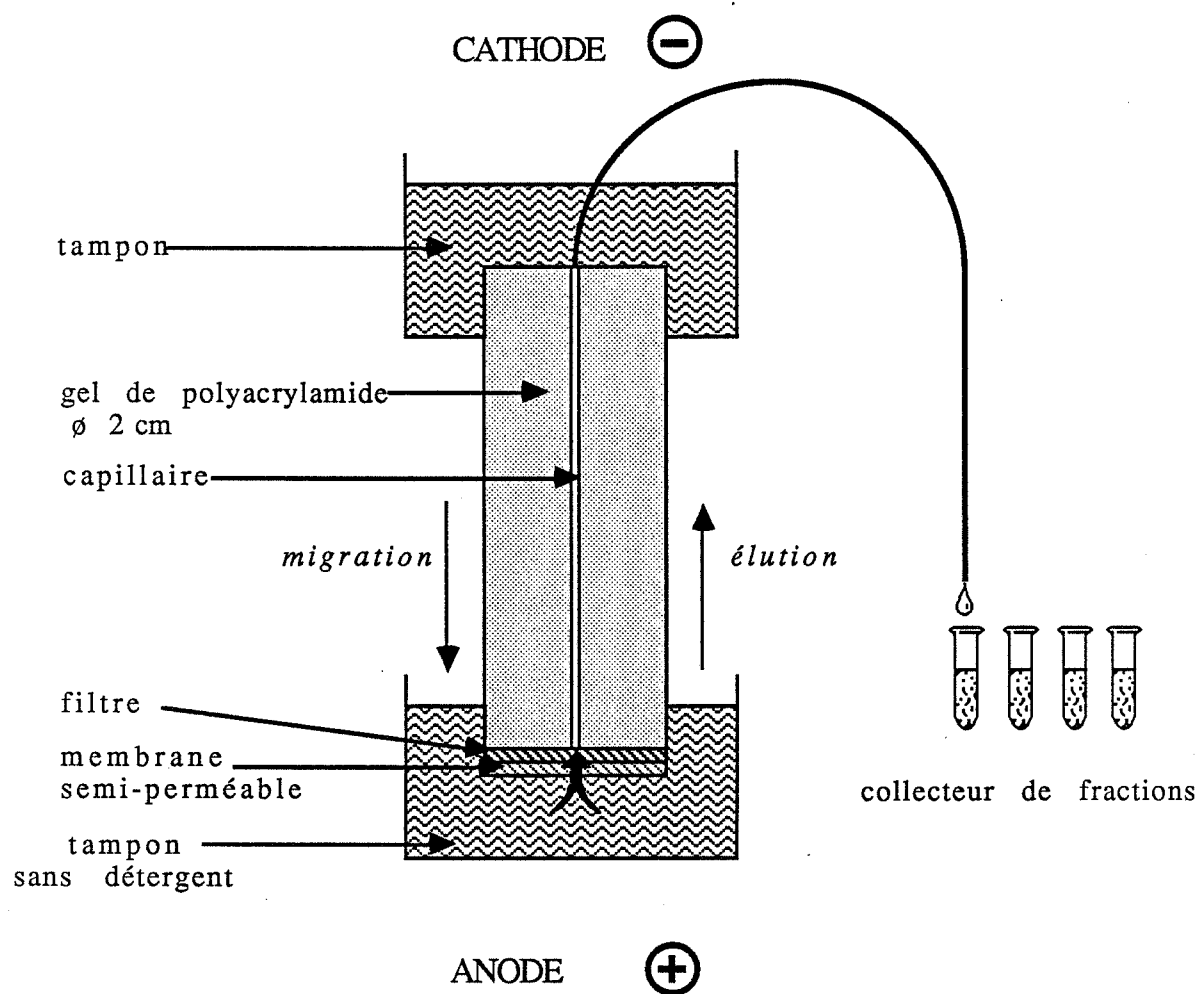


Figure 19 : Principe de l'électroendosmose ELFE® (GENOFIT)

Une membrane semi-perméable est disposée à la base d'un gel de polyacrylamide cylindrique de manière à réaliser une chambre de très faible volume. Cette chambre est reliée à l'extérieur par un capillaire disposé au centre du gel. Lorsque l'on applique un courant, le flux électroosmotique du tampon traverse la membrane de manière continue prévenant ainsi les interactions éventuelles entre les molécules séparées et la membrane. Le flux de tampon a pour effet de rincer continuellement la base du gel et d'éluer les molécules sortant de celui-ci en les faisant remonter dans le capillaire. L'extrémité du capillaire est reliée à un collecteur de fractions (FRAC 100, Pharmacia) ce qui permet de récupérer les molécules, après séparation, dans des fractions isolées.

Le gel utilisé a une composition analogue à celui décrit dans le Chapitre 5-1; il se présente sous la forme d'un cylindre de 2 cm de diamètre et de 8 cm de long au centre duquel se trouve le capillaire.

Le tampon d'électrophorèse diffère selon les compartiments de l'appareil. La chambre du haut contient le tampon décrit au Chapitre 5-1, en revanche la chambre du bas est remplie avec un tampon ne contenant pas de détergent et dont la composition est la suivante :

- Tris-HCl, pH = 6,8	25 mM
- Glycine.....	200 mM
- H ₂ O qsp	1 l

Ce tampon est dégazé avant utilisation. L'absence de détergent et le dégazage permettent d'éviter la formation de bulles dans le capillaire qui pourraient empêcher l'élution en gênant le flux électroosmotique du tampon. On dépose 100µl d'échantillon de LPS à 5mg.ml⁻¹.

Le contenu des fractions récoltées est testé en électrophorèse analytique afin d'identifier les LPS présents dans chacune d'elles.

7 - ETUDE BIOCHIMIQUE DES LPS

7-1 SPECTRE D'ABSORPTION

La contamination des préparations de LPS par les acides nucléiques est estimée par la mesure de la densité optique d'une solution aqueuse à 50 µg.ml⁻¹ entre 180 nm et 340 nm. Nous avons utilisé un spectrophotomètre KONTRON type UVIKON 860 et des

cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. La présence éventuelle d'acides nucléiques se traduit par un pic d'absorption ayant son maximum à 260 nm.

7-2 DOSAGE DES PROTÉINES

La présence de protéines dans les échantillons est évaluée à l'aide du kit de dosage BCA (Pierce) basé sur une méthode qui dérive de la réaction du Biuret (réaction de complexation des protéines avec les ions Cu^{2+} en milieu alcalin). L'albumine bovine est utilisée comme standard. On ajoute 2 ml de réactif à 100 μl d'une solution de LPS à 1 mg.ml^{-1} . Après incubation à + 60°C durant 30 minutes la densité optique est lue à 562 nm.

7-3 DOSAGE DES HEXOSES TOTAUX [SHIELDS et coll., 1960]

Les échantillons (50 μg de LPS dilués dans 250 μl d' H_2O) sont mélangés avec 750 μl d'une solution d'anthrone à 0,2 % dans l'acide sulfurique. Après chauffage pendant 10 minutes à + 100°C puis refroidissement, la densité optique est lue à 620 nm. Le glucose, entre 10 et 100 nmoles, est utilisé comme référence .

7-4 DOSAGE DE LA GLUCOSAMINE

Les hexosamines sont N-acétylées et dosées selon la méthode de Morgan-Elson [STROMINGER et coll., 1959]

Les échantillons (1 mg) sont hydrolysés par 500 μl d' HCl 4N à + 100°C pendant une nuit. L'acide est éliminé sous pression réduite, les tubes sont repris par 500 μl d' H_2O distillée, séchés sous vide ainsi que les solutions témoins contenant de 1 à 10 nmoles de glucosamine.

Après séchage, on ajoute dans chaque tube 50 μl d'eau saturée en NaHCO_3 et 10 μl d'une solution aqueuse d'anhydride acétique à 5 % préparée extemporanément. Les tubes sont laissés 10 minutes à température ambiante. L'excès d'anhydride acétique est ensuite détruit en chauffant 3 minutes à + 100°C. On ajoute alors 50 μl d'une solution de tétraborate de potassium à 5 % et l'on chauffe les tubes 7 minutes à + 100°C. Enfin, on additionne 700 μl de la solution suivante :

- 200 μl de réactif de Morgan-Elson : paradiméthylaminobenzaldéhyde à 16 % dans un mélange CH_3COOH - HCl (95 : 5 V/V).
- 500 μl de CH_3COOH concentré.

Après 20 minutes d'incubation à + 37°C l'absorption est lue à 585 nm.

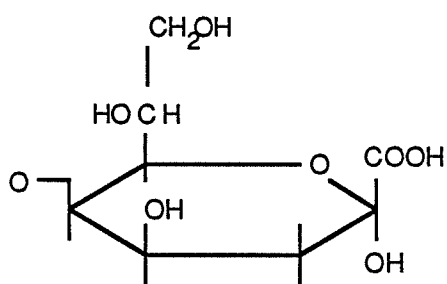


Figure 20 : Strucrure de l'acide 2-céto- 3 -désoxy-D-mannooctonique (KDO)

7-5 DOSAGE DU KDO PAR L'ACIDE THIOBARBITURIQUE

La Figure 20 rappelle la structure particulière du KDO = acide 2-céto-3 désoxy-D-manno-octonique. Nous avons utilisé la méthode d'OSBORN [OSBORN, 1963] modifiée par KARKHANIS [KARKHANIS et coll., 1978].

200 μ l d'échantillons contenant 400 μ g de LPS sont hydrolysés par 200 μ l d' H_2SO_4 0,5N à + 100°C pendant 8 minutes. Les témoins contenant de 5 à 50 nmoles de KDO sont hydrolysés dans les mêmes conditions. On ajoute ensuite 250 μ l d'une solution d'acide periodique (HIO_4) 0,04M dans l'acide sulfurique 0,5N. Après 20 minutes à température ambiante, 250 μ l d'une solution d'arsénite de sodium à 2,6 % dans HCl 0,5N sont additionnés. Les tubes sont agités quelques minutes à température ambiante. Après addition de 500 μ l d'acide thiobarbiturique à 0,6 %, les produits sont chauffés 15 minutes à + 100°C et 1 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) est immédiatement additionné. L'absorption est lue à 548 nm.

7-6 DOSAGE DU PHOSPHORE [LOWRY et coll., 1954].

- 200 μ g de LPS contenus dans 100 μ l d' H_2O purifiée ainsi que les témoins contenant de 10 à 100 nmoles de phosphore sont ajoutés à 100 μ l du mélange suivant :

- Acide sulfurique concentré	30,6 ml
- Acide perchlorique à 70 %.....	6,7 ml
- H_2O qsp	100 ml

Les échantillons sont minéralisés par chauffage pendant 1 heure à + 100°C, puis la température est augmentée progressivement jusqu'à + 165°C en 30 minutes et les échantillons y sont maintenus durant 210 minutes. Après refroidissement on ajoute 1 ml de réactif préparé extemporanément à partir de 9 ml de la solution A et 1 ml de la solution B dont les compositions sont les suivantes :

Solution A :

- Acétate de sodium 1M.....	1 ml
- Molybdate d'ammonium à 0,25 %	1 ml
- H_2O purifiée.....	7 ml

Solution B

- Acide ascorbique à 10 % (P/V) dans H₂O purifiée.

On porte à + 38°C au bain-marie pendant 90 minutes et l'absorption est lue à 700 nm.

7-7 DOSAGE DES ACIDES URONIQUES [BITTER et coll., 1962]

A 150µl des échantillons, et des solutions témoins contenant de 0 à 100 nmoles d'acide glucuronique et de 0 à 100 nmoles de glucose, sont ajoutés à + 4°C, 900 µl d'une solution de tétraborate de sodium 0,025M dans l'acide sulfurique concentré. Après 10 minutes à + 100°C, on ajoute 30 µl de carbazole à 0,125% dans l'éthanol. Après 15 minutes d'incubation à + 100°C, l'absorption est lue à 530 nm. Les valeurs obtenues sont corrigées en fonction de l'absorption due aux hexoses qui interfèrent dans le dosage.

Celle-ci est calculée grâce à la gamme effectuée avec le glucose.

7-8 ANALYSE DES SUCRES RÉDUITS ET ACÉTYLÉS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE [SAWARDEKER, et coll., 1965]

7-8-1 Préparation des acétates d'alditols

Les échantillons (1 mg) sont hydrolysés par HCl 0,1N pendant 48h à + 100°C dans des ampoules scellées. Cette étape permet de couper les liaisons osidiques et d'obtenir chaque sucre sous forme libre.

Les hydrolysats sont neutralisés par une résine échangeuse d'anions : l'Amberlite IRA 410 préalablement conditionnée dans de l'eau saturée en bicarbonate de sodium puis rincée à l'eau purifiée jusqu'à neutralité.

On laisse neutraliser environ 1 heure et l'on vérifie la valeur du pH. Les échantillons sont filtrés sur laine de verre dans des ballons et évaporés à sec. Les sucres obtenus sont réduits par une solution de borohydrure de sodium (NaBH₄) à 3 mg/ml préparée extemporanément, pendant une nuit à température ambiante. Cette étape a pour conséquence d'ouvrir le cycle des sucres.

Le contenu des ballons est traité par une résine la Dowex 50 X 4 - 200 (conditionnée 15 minutes dans HCl N et rincée jusqu'à neutralité) jusqu'à ce que le pH des échantillons atteigne une valeur de 5.

Après évaporation à sec, l'acide borique libéré au cours de la réaction est éliminé sous forme de borate de méthyle par trois distillations successives en présence de méthanol.

Les alditols obtenus sont acétylés par 2 ml du mélange pyridine-anhydride acétique (1 : 1, V/V) pendant 20 min à + 100°C dans un bain d'huile. On ajoute dans chaque ballon 3 ml de toluène et ceux-ci sont évaporés à sec à + 70°C. Cette opération est répétée cinq fois afin d'éliminer la pyridine et l'anhydride acétique.

Le contenu des ballons est alors repris par 2 ml de chloroforme, on ajoute une spatule de sulfate de sodium (Na_2SO_4) pour éliminer d'éventuelles gouttes d'eau. On filtre les échantillons sur papier filtre puis on évapore sous un courant d'azote.

7-8-2 Analyse des acétates d'alditols par chromatographie en phase gazeuse

Les acétates d'alditols sont repris par le chloroforme et analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire SP 2380 (Supelco, 30 m x 0,25 mm) à + 250°C.

Le chromatographe est un appareil Hewlett-Packard 5890A équipé d'un injecteur à diviseur, dont le taux de division varie entre 1/50 et 1/100 selon les échantillons, et d'un détecteur à ionisation de flamme.

Les sucres sont identifiés suivant leur temps de rétention par comparaison avec des acétates d'alditols témoins.

Conditions opératoires :

- Température de l'injecteur : + 300°C
- Température du four : + 250°C
- Température du détecteur : + 300°C
- Gaz vecteur Helium NSS à un débit de 2 ml.min⁻¹.

7-9 ANALYSE DES ACIDES GRAS DES LPS

7-9-1 Extraction des acides gras [RIETSCHEL et coll., 1972]

Les acides gras totaux présents dans les LPS sont libérés par hydrolyse chlorhydrique : 1 mg de produit est hydrolysé dans 0,5 ml d'HCl 4N à + 100°C pendant 4 heures. Ils sont extraits ensuite, 3 à 5 fois par le chloroforme. L'eau est éliminée par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) et les échantillons sont filtrés sur papier filtre puis évaporés sous azote.

7-9-2 Méthylation des acides gras

Les extraits sont repris par 1 ml de méthanol puis méthylés par le diazométhane préparé extemporanément à partir de N-méthyl-N-nitroso-P-toluène sulfonamide introduit dans 1 ml de KOH méthanolique à 40 % et 5 ml d'éther sous agitation magnétique.

7-9-3 Analyse des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire SP2100 (Supelco, 30 m x 0,32 mm). Le chromatographe est le même que celui décrit au Chapitre 7-8-2 avec un injecteur sans division et un détecteur à ionisation de flamme.

Conditions opératoires :

- Température de l'injecteur : + 210°C
- Température du détecteur : + 250°C
- Gaz vecteur : Hélium, débit 3,6 ml.min⁻¹
- Température du four :
 - Programmation :
 - température initiale + 50°C
 - première rampe de 40°C.min⁻¹ jusqu'à + 140°C
 - deuxième rampe de 4°C.min⁻¹ jusqu'à + 250°C et stabilisée 8 minutes à cette température.

L'identification des acides gras dérivés est effectuée dans un premier temps par comparaison avec des esters méthyliques d'acides gras saturés témoins et confirmée par

une chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sur colonne capillaire DB-1 (30 m x 0,33 mm) avec un injecteur sans division, le détecteur étant un spectromètre de masse de type 70-SEQ.

Conditions opératoires :

- Gaz vecteur : Hélium à un débit de 3 ml.min⁻¹
- Programmation :
 - température initiale + 60°C (1 min)
 - première rampe de + 30°C.min⁻¹ jusqu'à 120°C
 - deuxième rampe de + 2°C.min⁻¹ jusqu'à + 280°C et
 - stabilisation 20 minutes à cette température.

7-10 ANALYSE DES GROUPEMENTS PHOSPHATE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU PHOSPHORE ³¹P [ROSNER et coll., 1979].

L'analyse des groupements phosphate par résonance magnétique nucléaire du phosphore (³¹P) a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker WM-300 à la fréquence de 121,51 MHz. Les déplacements chimiques sont enregistrés par rapport à un étalon externe, l'acide phosphorique à 85%, pris comme standard pour effectuer le zéro de l'appareil.

Les échantillons de LPS (≈ 3 mg) sont repris dans 2,5 ml de D₂O contenant 5 mM d'EDTA et 2% de DOC à pH = 7,3/7,6 et disposés dans des tubes cylindriques de longueur 180 mm et de 9 mm de diamètre interne.

8 - DOSAGE D'ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES LPS

8-1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ LAL

L'estimation de l'activité de nos échantillons vis-à-vis du Lysat d'Amœbocytes de Limule a été réalisée avec des kits de dosage LAL chromogénique. Nous avons utilisé, soit le kit "Coatest Endotoxin" (Kabi-Vitrum AB Stockholm, Sweden), soit le kit "QCL-1000" (Witthaker Bioproducts Inc. Walkersville, Maryland).

50 µl de dilutions logarithmiques d'échantillons sont incubés à + 37°C avec 50 µl de Lysat d'Amœbocyte dans une plaque de microtitration à fond plat (Nunc). Après 11 ou

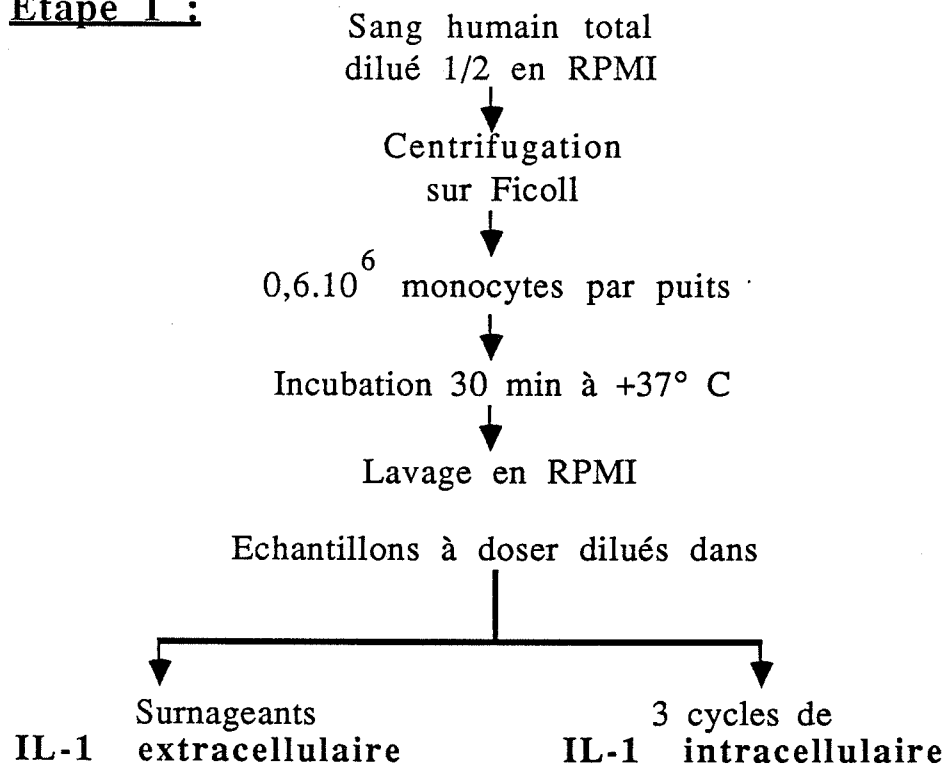
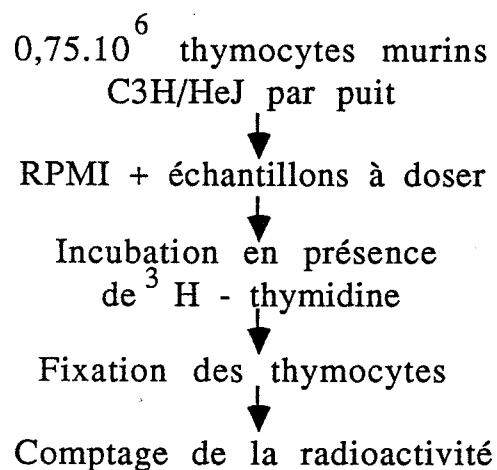
Etape 1 :**Etape 2 :**

Figure 21 : Test d'induction de la synthèse d'interleukine-1 (IL-1) par des monocytes humains *in vitro*.

12 minutes, selon les lots de LAL, on ajoute 100 µl de substrat chromogénique et on laisse la réaction se développer durant 3 minutes pour le kit "Coatest Endotoxin" et 6 minutes pour le kit "QCL-1000". La réaction est stoppée par addition de 100 µl d'acide acétique à 50 %.

La densité optique de chaque cupule est lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque "Titertek Multiscan" à 405 nm. L'activité spécifique est déterminée vis-à-vis d'une endotoxine de référence de *Escherichia coli* O111:B4 calibrée sur le standard E.C.5 de la F.D.A..

L'activité est exprimée en unité d'endotoxine par nanogramme de LPS (EU/ng). Une unité d'endotoxine étant définie comme la réponse colorimétrique obtenue avec 0,1 ng de LPS de *E. coli* O111:B4.

8-2 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ INTERLEUKINE-1(IL-1) [NEWTON, 1986].

Ce test est basé sur la capacité des LPS à induire la synthèse et la sécrétion d'interleukine 1 par des monocytes humains *in vitro* (Figure 21).

Les monocytes du sang périphérique sont séparés par centrifugation différentielle sur Ficoll et répartis dans des plaques de culture en plastique (Falcon) à raison de 5.10^5 monocytes par puits, en absence de sérum afin de permettre leur adhérence, pendant 45 min à + 37°C. Parmi les cellules adhérentes au plastique, le pourcentage de monocytes est estimé par une coloration histochimique permettant la recherche d'une activité estérase non spécifique. [TUCKER et coll. 1977].

L'induction de la synthèse d'IL-1 est réalisée en disposant dans chaque puits 500 µl de milieu RPMI 1640 contenant 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine en absence de sérum, avec ou sans LPS. Après 20 h de culture à + 37°C les surnageants sont récoltés, centrifugés et testés pour leur activité IL-1 à une dilution appropriée.

L'IL-1 présente dans le surnageant des cupules représente l'IL-1 extracellulaire sécrétée. L'activité IL-1 intracellulaire est déterminée après la lyse des cellules adhérentes, obtenue après 3 cycles de congélation/décongélation dans 500 µl de RPMI 1640.

La mesure de l'activité IL-1 est réalisée avec un essai de prolifération de thymocytes murins C3H/HeJ en présence de Con A (mitogène).

Les résultats sont donnés par la quantité de thymidine (^3H) incorporée au cours de la culture par $0,75 \cdot 10^6$ thymocytes exprimés en cpm.

9 - ULTRAFILTRATION DES LIPOPOLYSACCHARIDES

Nous avons ultrafiltré les LPS extraits sur des membranes possédant des poids moléculaires nominaux limites (PMNL) ou seuils de coupure décroissants dans le but d'estimer jusqu'à quelle masse moléculaire, les LPS sont susceptibles de traverser ces membranes. Ceci a été réalisé grâce au système Novacell® (FILTRON). Cette expérience doit nous permettre d'établir une relation entre la taille du LPS, son comportement électrophorétique et ses activités biologiques.

Les membranes utilisées sont des membranes en polymère de poly-éther-sulfone (PES) conditionnées dans une cellule prête à l'emploi stérile et apyrogène.

Nous utilisons les membranes de PMNL : 10 Kda, 8 Kda, 5 Kda, 3 Kda et 1 Kda. L'ultrafiltration est réalisée sous une pression d'azote de 2 bars, à l'exception de la membrane 1 Kda pour laquelle la pression nécessaire est de 3 bars. Les membranes sont rincées par 10 ml d' H_2O PPI avant utilisation.

5 ml d'une suspension de LPS à 1 mg/ml dans H_2O PPI sont homogénéisés par agitation vigoureuse et sonication à l'aide d'une microsonde reliée à un générateur BRANSON (500 watts) réglé à la puissance 4, durant 20 secondes, en mode pulsé afin de favoriser la dispersion des LPS.

Après ultrafiltration à sec, le rétentat est repris par 2 ml d' H_2O PPI et l'ultrafiltration est poursuivie jusqu'à ce que le volume du rétentat soit de 1 ml.

Le volume de l'éluat est alors de 6 ml. Après homogénéisation 1 ml est prélevé pour effectuer les différents dosages. Le volume de l'échantillon est donc de 5 ml et l'on poursuit ainsi la cascade d'ultrafiltration jusqu'à la membrane 1 Kda.

Les différents échantillons sont testés pour leurs activités biologiques vis-à-vis du test LAL et du test IL-1. Nous prélevons également 200 μl qui sont lyophilisés en vue d'effectuer une électrophorèse (DOC-PAGE).

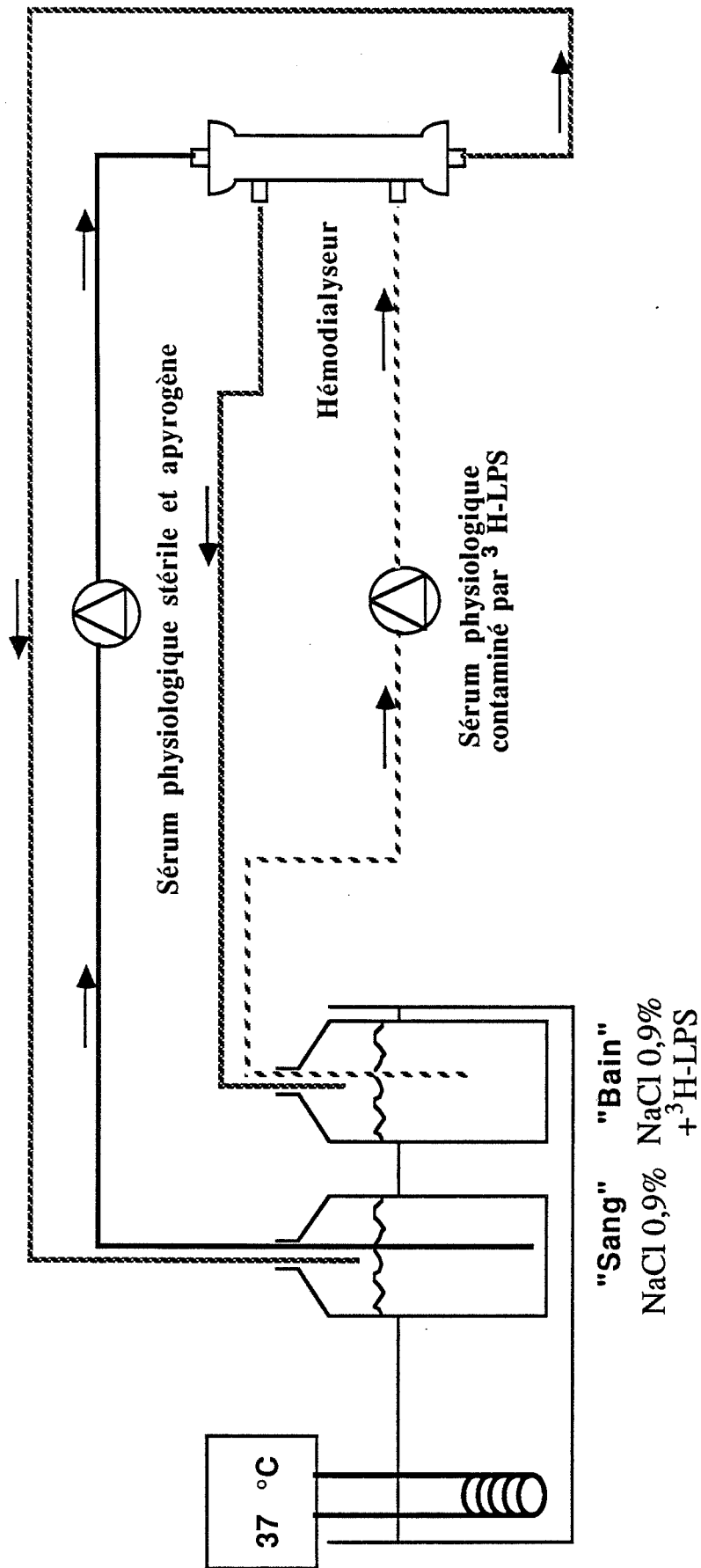


Figure 22 : Banc d'essai pour l'évaluation du transfert des LPS à travers les membranes de dialyse.

10 - MARQUAGE RADIOACTIF DES LPS

Le marquage radioactif des LPS par le tritium ^3H a été réalisé selon la technique de WATSON et RIBLET [WATSON et coll., 1975] légèrement modifiée.

Les LPS sont oxydés en présence de NaIO_4 (7.10^{-2}M) pendant 150 min à température ambiante puis réduits en présence de 25 mCi de NaB^3H_4 (possédant une radioactivité spécifique de 16 Ci par mM) durant une nuit à $+4^\circ\text{C}$. Après élimination de l'excès de borohydrure, les LPS sont ultracentrifugés 60 min à 150.000 g. Cette dernière opération est répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de radioactivité détectable dans le surnageant. L'activité spécifique du LPS marqué de *P. testosteroni* est de $4,25.10^6$ cpm. μg^{-1} .

11 - TEST DE PERMÉABILITÉ DES MEMBRANES DE DIALYSE AUX LPS EXTRAITS ET RADIOMARQUÉS

Nous avons testé la perméabilité de différentes membranes d'hémodialyse vis-à-vis des LPS I de *P. testosteroni* 871204 radiomarqués (^3H -LPS).

L'évaluation de la perméabilité a été réalisée *in vitro* grâce au banc d'essai décrit par la Figure 22. Il est composé de deux circuits distincts, le circuit "Bain" dans lequel circule du NaCl 9‰ contaminé par les ^3H -LPS et un circuit "Sang" qui contient initialement du NaCl 9‰ stérile et apyrogène. L'ensemble est thermostaté à $+37^\circ\text{C}$. Le débit de liquide dans le compartiment "Bain" est de 500 ml.min^{-1} et dans le compartiment "Sang" de 250 ml.min^{-1} .

Ce montage nous place dans des conditions similaires à celles d'une séance d'hémodialyse normale. La différence majeure se situe au niveau du liquide qui circule dans le compartiment "Sang" du circuit, où le sang humain est substitué par du NaCl 9‰ stérile et apyrogène.

Nous avons testé trois types de membrane :

- la membrane Cuprophan® en cellulose régénérée,
- la membrane en polysulfone et
- la membrane AN69® qui est un copolymère d'acrylonitrile et de méthallylsulfonate de sodium,

conditionnées sous la forme d'hémodialyseurs commerciaux, à fibres creuses, respectivement :

- Cuprophan® NT 1108 (Sorin Biomedica, Italie)
- polysulfone Hemoflow F60 (Fresenius, RFA)
- AN69® Filtral 10 (Hospal, France)

avec des surfaces membranaires développées respectives de 1,06 m² ; 1,25 m² et 0,85 m².

Au temps T₀, la radioactivité ajoutée dans le compartiment "Bain" est de 2,74.10⁵ cpm.ml⁻¹, elle correspond à une contamination pondérale de 65 ng.ml⁻¹ de LPS. Des prélèvements sont effectués à des temps précis simultanément dans les deux compartiments.

RESULTATS
RESULTATS
RESULTATS

RÉSULTATS

BACTÉRIES DE TYPE GRAM NÉGATIF :		
genre <i>Pseudomonas</i> :		
119 souches ont été isolées		
Total	119	87,5 %
Autres genres :	12	8,8 %
Total des bactéries à Gram négatif	131	96,3%
BACTÉRIES DE TYPE GRAM POSITIF :		
<i>Staphylococcus</i>	3	2,2%
Total des bactéries	134	98,5%
CHAMPIGNONS :		
<i>Candida</i>	2	1,5%
Total des micro-organismes	136	100%

Tableau 7 : Identification des micro-organismes isolés des liquides de dialyse.

RÉPARTITION DES ESPÈCES AU SEIN DU GENRE *PSEUDOMONAS* :

<i>Pseudomonas cepacia</i>	36	30,3%
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	20	16,8%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	9,2%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11	9,2%
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	10	8,4%
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	5	4,2%
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	3,4%
<i>Pseudomonas putida</i>	3	2,5%
<i>Pseudomonas sp.</i>	19	16,0%
Total :	119	100 %

Tableau 8 a : Identification des espèces de *Pseudomonas* isolées des liquides de dialyse.

1 - ÉTUDE DES MICRO-ORGANISMES CONTAMINANTS LES LIQUIDES DE DIALYSE

Nous avons entrepris l'identification et la caractérisation des principaux germes rencontrés dans les liquides de dialyse. Plusieurs équipes ont en effet montré l'existence d'une contamination bactérienne [JANS et coll 1978; JENKINS et coll, 1987; MAN et coll, 1988; RAJ et coll, 1973; MONTAGNAC et coll, 1988; BAURMEISTER et coll, 1988].

1-1 IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES PRÉSENTS DANS LES CIRCUITS DE DIALYSE

Dans un premier temps, des numérations de germes ont été réalisées à partir d'échantillons provenant :

- soit de concentrés bicarbonates,
- soit de bains de dialyse dilués,
- soit de l'eau utilisée par le centre de dialyse.

Les résultats obtenus font apparaître un taux de contamination très variable entre les différents échantillons avec un maximum proche de 10^5 germes/ml. La conservation de ces concentrés, stockés le plus souvent à température ambiante, favorise le développement éventuel de micro-organismes.

Il faut rappeler qu'il n'existe ni en France ni en Europe de législation sur la fabrication des bains de dialyse concentrés, et sur le nombre de micro-organismes qu'ils hébergent. Il existe seulement des recommandations sur la qualité générale des liquides de dialyse.

Les observations macro et microscopiques des micro-organismes couplées à l'étude de leur biotype nous ont permis de dégager les données présentées dans le Tableau 7. Les résultats obtenus montrent que les bactéries représentent 98,5 % des germes isolés. Seules deux levures du genre *Candida* font exception.

Sur les 134 bactéries étudiées, seulement 3 (2,2 %) se sont avérées Gram positif et ont été identifiées comme appartenant au genre *Staphylococcus*. Les 131 bactéries restantes (96,3 % des micro-organismes isolés) sont donc de type Gram négatif dont l'immense majorité (91%) appartient au genre *Pseudomonas*, soit 119 souches.

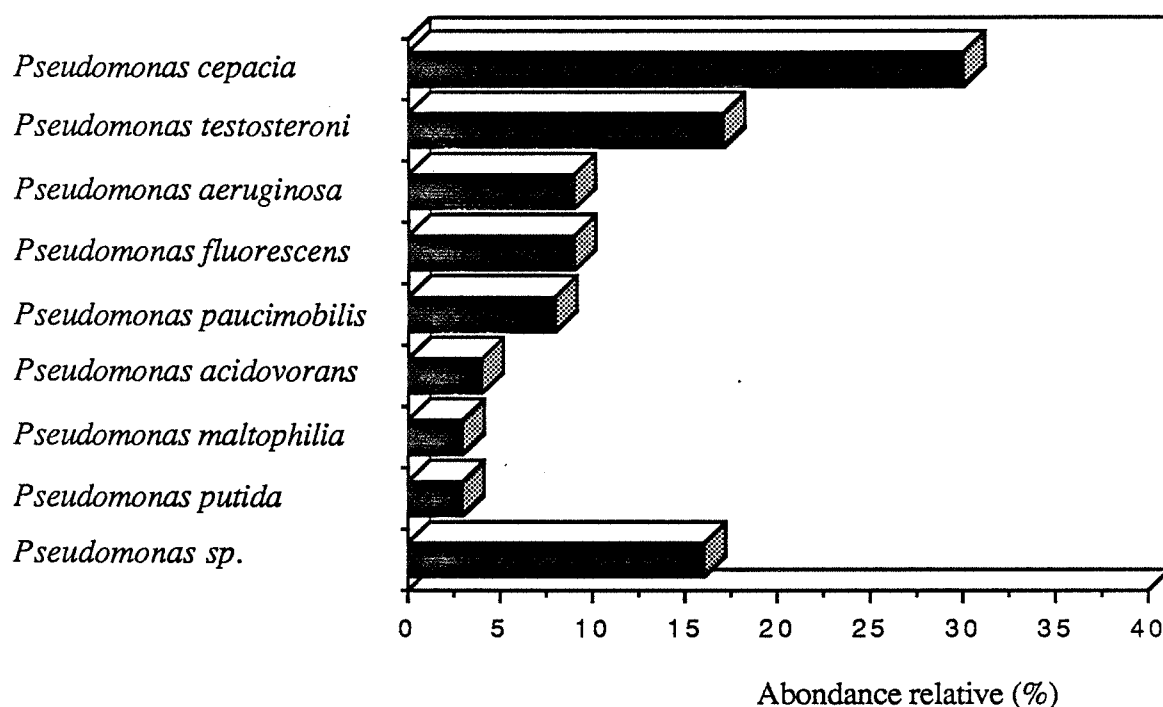


Figure 23: Représentation graphique de l'identification des espèces de *Pseudomonas* isolées des circuits de dialyse.

Concentré Bicarbonate :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i>
Dialysat :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Eau :	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>

Tableau 8 b : Localisation des espèces bactériennes isolées selon l'origine des prélèvements

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature [RAIJ et coll., 1973; BAURMEISTER et coll., 1988; MONTAGNAC et coll., 1988]. Le genre *Pseudomonas* est donc le genre prédominant : ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de la très grande capacité d'adaptation de la plupart des espèces qui le composent.

Nous avons pu déterminer, avec certitude, l'espèce pour 100 souches, 19 souches atypiques ne permettant pas une identification fiable. Les résultats, indiqués dans le Tableau 8 a et la Figure 23, font apparaître une prédominance des deux espèces *cepacia* et *testosteroni* qui représentent respectivement 30,3 % et 16,8 % des souches étudiées. Les espèces *aeruginosa* et *fluorescens* viennent ensuite avec 9,2 % chacune; les autres espèces sont isolées dans des proportions plus faibles.

1-2 ETUDE DE LA RÉPARTITION DES BACTÉRIES SELON L'ORIGINE DES PRÉLÈVEMENTS

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la répartition des espèces selon l'origine des prélèvements étudiés. Les résultats présentés Tableau 8b, montrent que dans les concentrés bicarbonates, se retrouvent exclusivement les deux espèces majoritaires, *cepacia* et *testosteroni* et ceci quelle que soit la provenance des bains concentrés. En effet, cette étude a été réalisée sur des concentrés provenant de plusieurs fabricants européens. Il semble donc que cette solution saline favorise de façon sélective la survie et le développement de ces deux espèces.

En ce qui concerne le dialysat, notre étude montre une répartition plus uniforme, on retrouve en effet l'ensemble des espèces identifiées. Quant aux espèces rencontrées dans l'eau, elles montrent également une grande variabilité.

Nous avons donc orienté notre étude sur les deux espèces les plus ubiquitaires, qui de plus sont les plus fréquemment rencontrées : *cepacia* et *testosteroni*. Ces deux espèces sont en outre retrouvées dans les concentrés bicarbonates, de façon exclusive et représentent à ce titre les sources de contaminations potentielles les plus probables des bains de dialyse.

Caractères Germes	Diamètre	Couleur	Contour	Opacité	Surface	Type
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101	3 mm	blanchâtre	régulier	opaque	lisse	S
<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204	2 mm	nacrée	régulier	peu opaque	lisse	S

Figure 24 a : Observation macroscopique des deux souches de *Pseudomonas* retenues, après culture sur Gélose Trypticase Soja (GTS).

BACTÉRIES	Biotype API 20 NE	Mobilité	Croissance à + 40°C
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101	1 467 777	+	N.T
<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204	1 000 244	+	-

N.T = Caractère non testé

Figure 24 b: Résultat de l'identification des souches, *P. cepacia* 871101 et *P. testosteroni* 871204 à l'aide des galeries API 20 NE et de tests complémentaires.

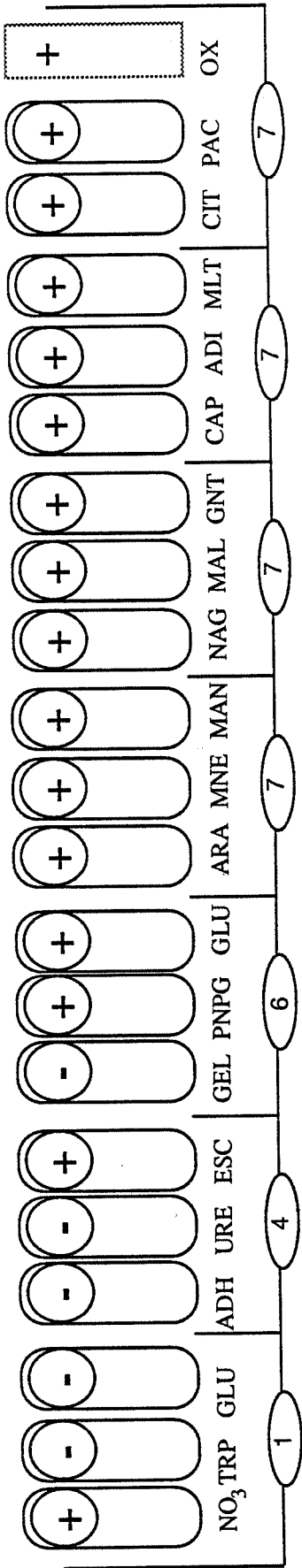


Figure 24 c : Biotyping de *Pseudomonas cepacia* 871101

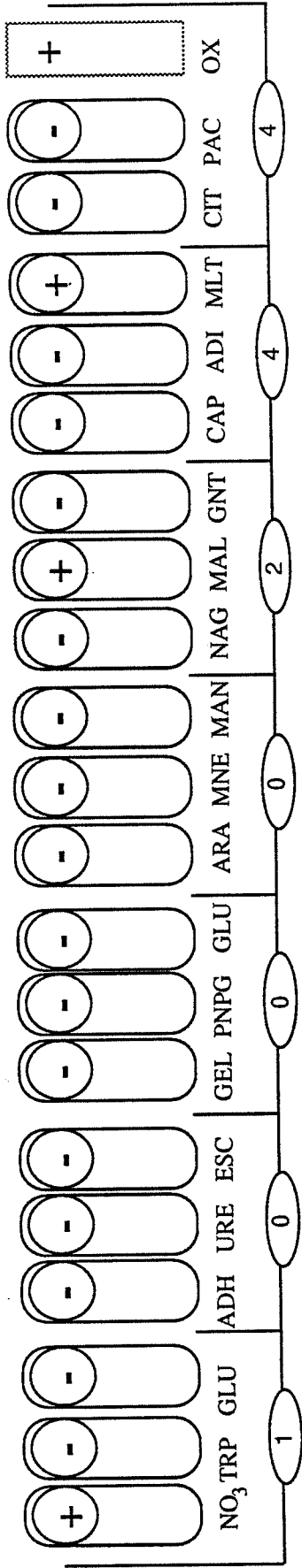


Figure 24 d : Biotyping de *Pseudomonas testosteroni* 871204

Figures 24 c, d : Identification des caractères biochimiques à l'aide des galeries API 20 NE et détermination du profil numérique.

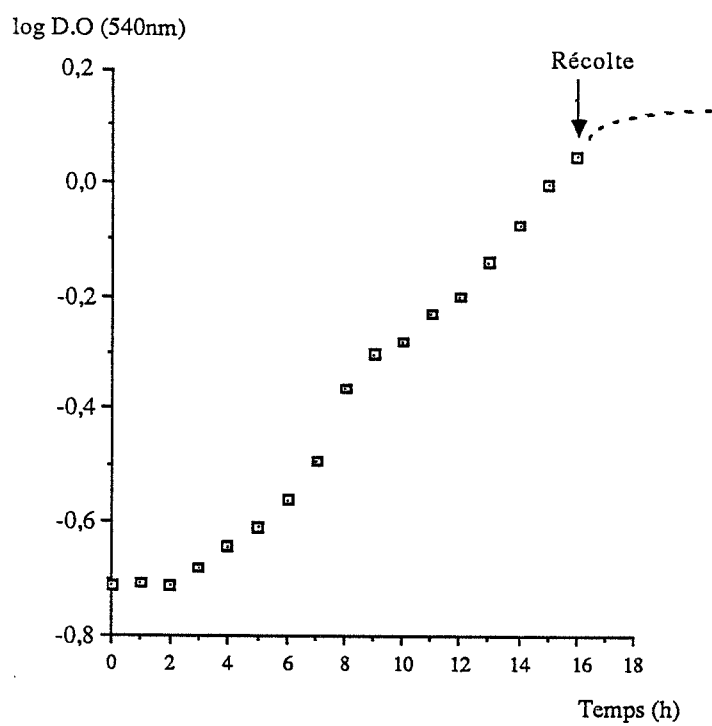


Figure 25 : Courbe de croissance de *Pseudomonas testosteroni* 871204

1-3 CHOIX DES SOUCHES BACTÉRIENNES

Notre choix dans l'étude et la caractérisation des germes rencontrés dans les bains de dialyse s'est donc porté sur deux souches : la souche 871101 et la souche 871204 appartenant respectivement aux espèces *cepacia* et *testosteroni*.

Nous n'avons pas retenu une souche de l'espèce *aeruginosa* car d'une part ces bactéries ne représentent que 9,2 % des bactéries isolées et d'autre part, de nombreuses études sur leurs LPS ont déjà été réalisées.

1-4 CONTROLE DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE *PSEUDOMONAS cepacia* ET *PSEUDOMONAS testosteroni* RETENUES

Les différents caractères révélés par l'observation macroscopique des colonies après 24 h de culture sur GTS sont regroupés dans la Figure 24 a. Les deux souches sont de type "S", elles possèdent donc des LPS contenant une chaîne O-spécifique.

Les biotypes obtenus sur les galeries API 20 NE sont exposés dans les Figures 24 c et 24 d pour *P. cepacia* 871101 et *P. testosteroni* 871204 respectivement.

L'analyse comparative du profil de *P. cepacia* 871101 avec la banque de données de chez API Système correspond à une très bonne identification de cette espèce (probabilité 99,9 %). En ce qui concerne la souche 871204 de *P. testosteroni*, l'identification a nécessité des tests complémentaires, tels que l'existence de mobilité et l'absence de croissance à + 40°C. Les résultats de ces deux tests nous ont permis d'identifier avec certitude l'espèce *testosteroni*. (Figure 24b)

Les problèmes que nous avons rencontrés au cours de l'identification des espèces bactériennes sont liés aux conditions de survie des bactéries dans les circuits de dialyse. Celles-ci peuvent entraîner la perte de certains caractères phénotypiques pour les bactéries qui deviennent alors plus ou moins atypiques. Une étude de leur (G + C %) permettrait une identification beaucoup plus précise.

1-5 CULTURE EN FERMENTEUR

Un exemple de courbe de croissance de *P. testosteroni* 871204, obtenue lors d'une expérience sur le fermenteur de 12 litres est donné sur la Figure 25. La récolte des bactéries est effectuée en fin de phase exponentielle mais avant la phase stationnaire.

Nous avons obtenu des rendements moyens de 15 à 20 g de bactéries sèches pour 10 litres de milieu de culture.

Lipopolysaccharide	<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101	<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204
LPS I Extraction P.C.P (Galanos)	0,05%	2,70%
LPS II Extraction Phénol aqueux à chaud (Westphal)	3,80%	3,35%

Tableau 9 : Rendements d'extraction des lipopolysaccharides exprimés en pourcentage du poids sec de bactéries

Lipopolysaccharide	<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101	<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204
LPS I Extraction P.C.P (Galanos)	2,40%	1,20%
LPS II Extraction Phénol aqueux à chaud (Westphal)	3,40%	2,60%

Tableau 10: Pourcentages de protéine dans les préparations de lipopolysaccharides estimés par la technique BCA (Pierce)

2 - EXTRACTION DES LPS

Les bactéries lyophilisées subissent dans un premier temps l'extraction des LPS par la méthode de GALANOS (LPS I) [GALANOS et coll., 1969]. Les résidus bactériens issus de cette première extraction sont soumis ensuite à l'extraction selon la méthode de WESTPHAL (LPS II) [WESTPHAL et coll., 1952].

Les rendements d'extraction, exprimés en pourcentage du poids sec de bactéries ou de résidus bactériens, sont présentés dans le Tableau 9.

L'extraction des LPS I effectuée sur *Pseudomonas cepacia* 871101 a abouti à un rendement très faible (0,05 %), ne nous permettant pas de réaliser toutes les analyses biochimiques ultérieures. En revanche, le rendement d'extraction des LPS II (3,80%), nous a procuré une quantité de LPS suffisante pour l'ensemble de ces analyses.

Pour *Pseudomonas testosteroni* 871204, les rendements d'extraction obtenus selon les deux techniques sont assez proches. Il apparaît donc que 50% des LPS sont extraits par une technique douce (P.C.P.) et 50% par la méthode de Westphal plus drastique.

La différence de rendements d'extraction observée pour *P. cepacia* 871101 est certainement liée à la structure des LPS, ou à leur ancrage au sein de la paroi bactérienne. Ceci peut conduire à une différence de solubilité des LPS dans les solvants organiques utilisés pour ces deux techniques.

Cette différence dans les rendements d'extraction, n'est pas une spécificité d'espèce, car une autre souche de *P. cepacia* étudiée au laboratoire nous a donné des résultats inverses.

Le degré de pureté des LPS extraits a été testé,

- pour la présence éventuelle de contamination par les acides nucléiques,
- pour la présence éventuelle de contamination par les protéines

2-1 SPECTRE D'ABSORPTION UV DES LPS EXTRAITS

Les profils obtenus pour les différents extraits sont regroupés dans les Figures 26 a, b, c et d. On peut établir une remarque générale pour l'ensemble des extractions. Le spectre des LPS I obtenus par la technique de Galanos montre une absence totale de pic à 254 nm. En revanche, le spectre d'absorption des LPS II obtenus par la technique de Westphal fait apparaître un léger pic à cette longueur d'onde, qui reflète la présence de traces d'acides nucléiques, dont le maximum d'absorption, 260 nm, est situé au voisinage

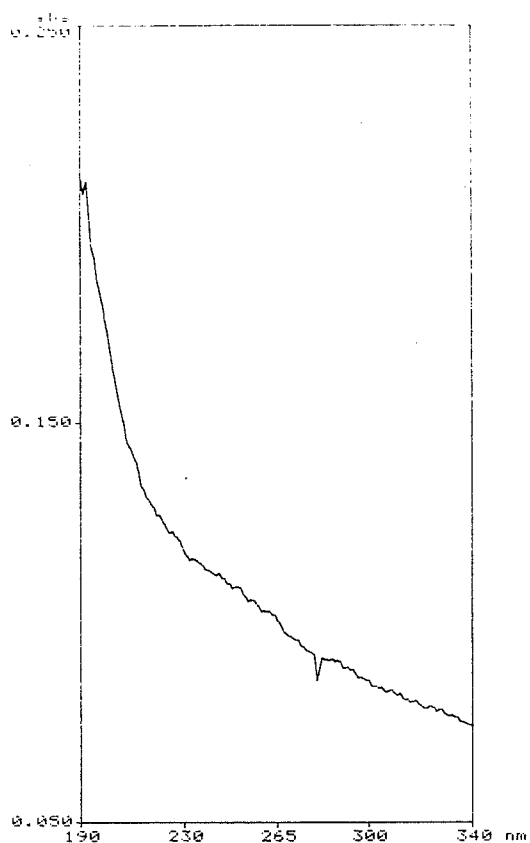


Figure 26a : Spectre UV des LPS I de *P. cepacia* 871101

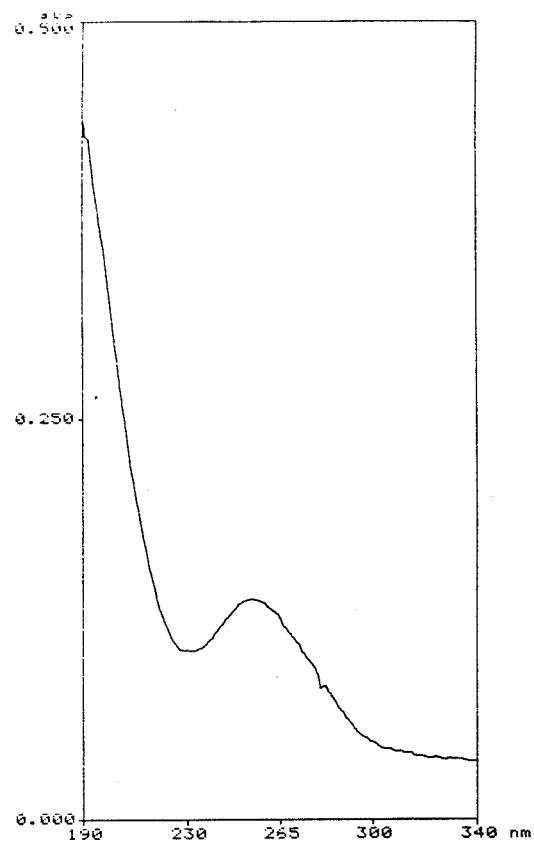


Figure 26b : Spectre UV des LPS II de *P. cepacia* 871101

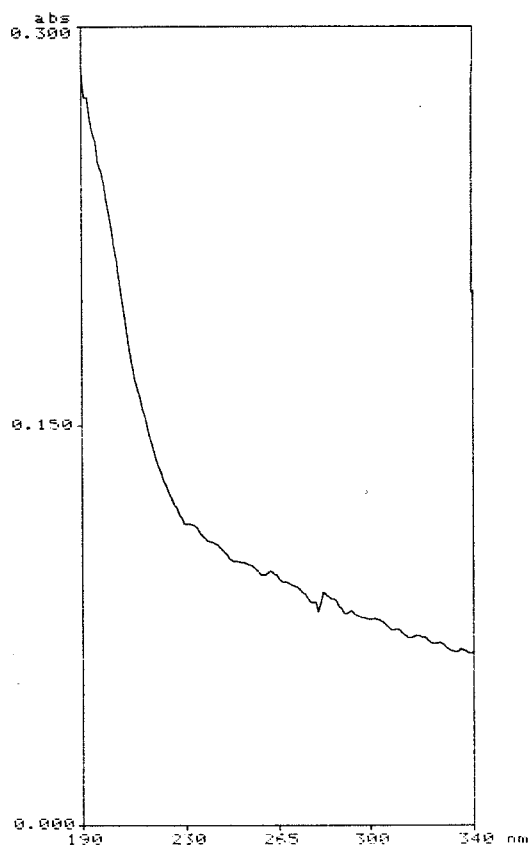


Figure 26c : Spectre UV des LPS I de *P. testosteroni* 871204

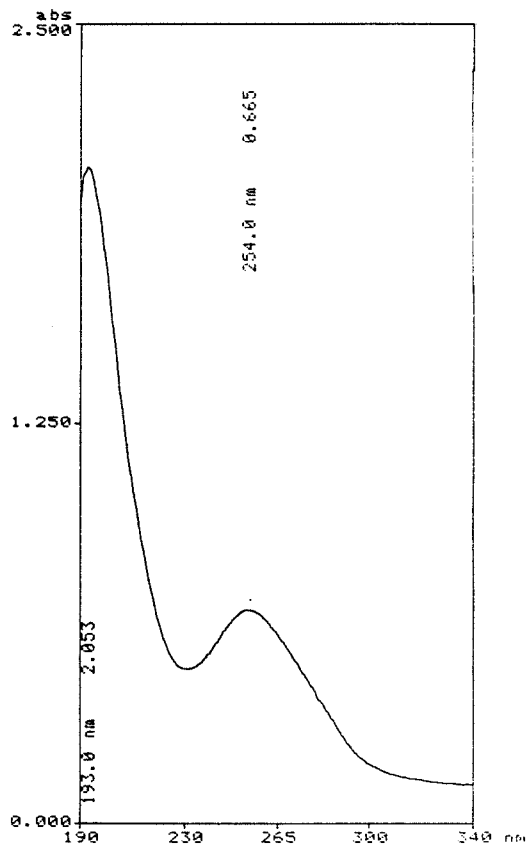


Figure 26d : Spectre UV des LPS II de *P. testosteroni* 871204

de cette longueur d'onde. Cette contamination des LPS II par les acides nucléiques est un résultat peu surprenant. En effet, la technique d'extraction au phénol aqueux à chaud extrait simultanément les LPS et les acides nucléiques. Cette contamination résiduelle est cependant très faible grâce notamment au traitement par les nucléases et à l'ultracentrifugation.

2-2 DOSAGE DES PROTÉINES

La détection de contamination des LPS extraits par les protéines est réalisée par la technique BCA (Pierce USA). Les résultats présentés dans le Tableau 10 font apparaître qu'une quantité plus importante de protéines se retrouve dans les LPS II.

La technique de Westphal est plus drastique, elle a tendance à extraire d'autres molécules que les LPS tels que les acides nucléiques ou les protéines. Le LPS II de *P. cepacia* 871101 contient 3,40 % de protéines. Ceci renforce l'hypothèse d'une association plus solide de ces LPS avec les autres constituants de la membrane externe de la paroi ce qui permettrait d'expliquer le faible rendement obtenu lors de l'extraction des LPS I de cette bactérie.

3 - ÉLECTROPHORÈSE DES LPS DE *P. cepacia* 871101 ET *P. testosteroni* 871204

L'analyse des LPS est réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les résultats obtenus présentés Figure 27 font apparaître une très grande différence entre les profils électrophorétiques des deux souches. Cependant, pour chacune d'elles, le comportement électrophorétique des LPS I et des LPS II est identique.

- Le profil électrophorétique des LPS de *P. testosteroni* 871204 montre une bande intense située au niveau du front de migration. Elle correspond au LPS de forme R composé uniquement du lipide A et du core oligosaccharidique. Les 6 ou 7 bandes qui apparaissent au-dessus représentent les formes S qui possèdent en plus de la structure de base, une, puis deux, puis trois ... sous-unités répétitives O-spécifiques comme l'indiquent les travaux d'HITCHCOCK [HITCHCOCK et coll., 1983]. Ces LPS se caractérisent par l'absence de longues chaînes polysaccharidiques composées de très nombreuses sous-unités répétitives.

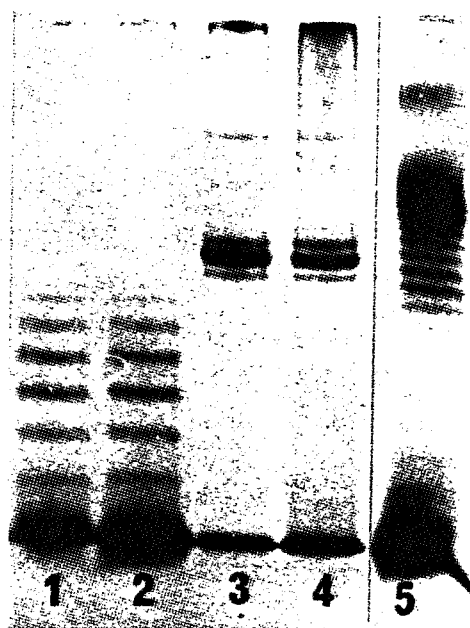


Figure 27 : Analyse des LPS par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de désoxycholate de sodium (DOC-PAGE).

- Piste 1 : LPS I de *Pseudomonas testosteroni* 871204
Piste 2 : LPS II de *Pseudomonas testosteroni* 871204
Piste 3 : LPS I de *Pseudomonas cepacia* 871101
Piste 4 : LPS II de *Pseudomonas cepacia* 871101
Piste 5 : LPS II de *Escherichia coli* O111:B4

- Le profil électrophorétique des LPS de *P. cepacia* 871101 montre également la bande intense, qui caractérise les formes R, au niveau du front de migration. Les formes S, quant à elles, apparaissent sous l'aspect d'un groupe intermédiaire composé de trois bandes très rapprochées, la bande centrale étant la plus intense, et d'une bande isolée très peu intense qui migre encore moins rapidement. Si l'on augmente la charge de l'échantillon, une à deux bandes supplémentaires sont visibles au niveau du groupe intermédiaire.

La structure particulière des LPS de *P. cepacia* 871101 a déjà été observée pour une autre espèce bactérienne, l'espèce *Aeromonas*, [DOOLEY et coll., 1985]. Cet aspect très particulier est en relation avec la présence d'une protéine cristalline au sein de la membrane externe de la paroi. La présence de cette protéine se traduit chez *Aeromonas* par une augmentation de la virulence. Il est possible que l'existence de cette protéine et ses interactions avec les LPS soient à l'origine de la plus grande contamination protéique observée pour le LPS II de *P. cepacia* 871101.

Le fait que les LPS I et LPS II aient le même aspect en électrophorèse indique que, sur un plan qualitatif, les deux techniques d'extraction sont équivalentes. Une étude des gels par densitométrie pourrait nous informer sur une extraction préférentielle d'une ou de plusieurs bandes, par l'une ou l'autre des deux techniques. Ces renseignements peuvent également être obtenus par la technique de l'électrophorèse capillaire.

4 - CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES LPS DE *P. cepacia* 871101 ET *P. testosteroni* 871204

4-1 ANALYSE DE LA COMPOSITION DES LPS

4-1-1 Dosages colorimétriques des constituants du LPS.

Les résultats concernant les dosages des hexoses, de la glucosamine, du KDO, du phosphore et des acides uroniques sont regroupés dans le Tableau 11.

Bactéries	LPS	HEXOSES	GLUCOSAMINE	KDO	PHOSPHORE	AC URONIQUES
<i>P. cepacia</i> 871101	LPS I (Galanos)	24,00%	NR	NR	1,20%	NR
	LPS II (Westphal)	26,95%	6,80%	0,40%	1,48%	0,73%
<i>P. testosteroni</i> 871204	LPS I (Galanos)	14,75%	4,40%	1,20%	2,70%	2,47%
	LPS II (Westphal)	15,75%	4,45%	1,10%	2,25%	0,31%
<i>P. cepacia</i> CIP 8024 (ATCC 25416)	LPS I (Galanos)	20,40%	4,4%	1,7%	0,9%	0,21%
	LPS II (Westphal)	20,30%	4,7%	1,7%	1,1%	0,14%
<i>P. testosteroni</i> CIP 5924 (ATCC 11996)	LPS I (Galanos)	NR	NR	NR	2,1%	NR
	LPS II (Westphal)	NR	NR	NR	1,95%	NR

NR = dosage non réalisé pour cet échantillon

Tableau 11: Dosages colorimétriques des constituants des LPS I et LPS II des souches de *P. cepacia* 871101 et *P. testosteroni* 871204 et des souches de références : *P. cepacia* CIP 8024 (ATCC 25416), *P. testosteroni* CIP 5924 (ATCC 11996).

4-1-1-1 Dosage des hexoses :

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative quant aux pourcentages d'hexoses présents dans le LPS I et le LPS II et ce pour les deux souches testées.

Toutefois, avec 24 % à 27 % d'hexoses, les LPS de *P. cepacia* 871101 sont plus riches en hexoses que ceux de *P. testosteroni* 871204, qui n'en comptent que 15 % environ. Ce résultat peut s'expliquer par la plus grande longueur de la chaîne polysaccharidique (O-spécifique) des LPS de *P. cepacia* 871101, comme nous l'avons montrée par l'analyse en électrophorèse.

La souche de référence, *P. cepacia* CIP 8024, (ATCC 25416), montre également, avec environ 20,3%, une teneur en hexoses identique pour les LPS issus des deux techniques d'extraction que nous avons utilisées.

4-1-1-2 Dosage de la glucosamine

Les résultats montrent qu'une quantité identique de glucosamine est retrouvée pour les LPS I et II de *P. testosteroni*, respectivement égale à 4,40 % et 4,45 %.

L'analyse comparative de la glucosamine entre le LPS I et II n'a pu être réalisée pour *P. cepacia* 871101, en raison de la faible quantité de LPS I obtenue après l'extraction par la technique de Galanos (Cf. Chapitre 2, Tableau 9).

On remarque également que la quantité de glucosamine présente dans le LPS II de *P. cepacia* 871101 (6,8 %) est plus importante que celle présente dans le LPS II de *P. testosteroni* 871204 (4,45%). Toutefois, ce pourcentage élevé ne reflète pas une spécificité d'espèce, car d'autres souches étudiées au laboratoire, telle que la souche de référence *P. cepacia* CIP8024 (ATCC 25416), font apparaître des teneurs en glucosamine plus faibles, de l'ordre de 4,4 % à 4,7 % pour les LPS I et LPS II respectivement.

La haute teneur relative en glucosamine du LPS II de *P. cepacia* 871101 (6,8 %) peut s'expliquer d'une part, par l'existence d'oses aminés rentrant dans la composition de la chaîne polysaccharidique de *P. cepacia* 871101 qui interféreraient dans le dosage, et d'autre part par la longueur de la chaîne O-spécifique de ce LPS.

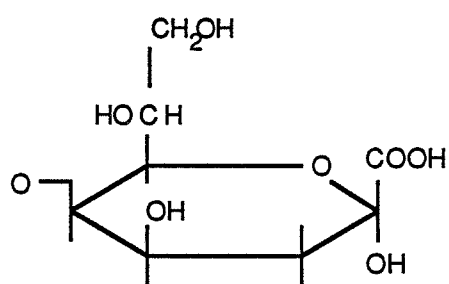


Figure 28 : Structure de l'acide 2-céto- 3 -désoxy-D-mannooctonique (KDO)

4-1-1-3 Dosage du KDO

La structure du KDO est rappelée sur la Figure 28.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en KDO est pratiquement identique pour les LPS I et II de *P. testosteroni* 871204 avec respectivement 1,2 % et 1,1 %.

En revanche, le dosage du KDO du LPS II de *P. cepacia* 871101 révèle un taux très faible de 0,4 %. Cette teneur en KDO n'a pas été retrouvée chez les autres souches de cette espèce étudiées au laboratoire telle que *P. cepacia* CIP 8024 par exemple dont les LPS I et II ont une teneur en KDO identique, égale à 1,7 %.

MANNIELLO rapporte une absence de KDO dans les LPS de *P. cepacia* (ATCC 25416) et de *P. cepacia* 153 extraits par la technique de Westphal [MANNIELLO et coll., 1979]. WILKINSON indique également que l'espèce *rubescens* ne contient pas de KDO, et souligne que la quantité de KDO peut varier selon les espèces de *Pseudomonas* [WILKINSON et coll., 1973].

CAROFF montre qu'après traitement des LPS par l'acide fluorhydrique, on peut trouver du KDO, dans des LPS qui ne semblent pas en contenir initialement. Toutefois cette technique n'a jamais été appliquée aux LPS de *Pseudomonas* [CAROFF et coll., 1987].

4-1-1-4 Dosage du phosphore

Pour les deux souches retenues dans notre étude, les teneurs en phosphore des LPS I et II sont identiques. Nous avons confirmé ce résultat pour la souche de référence *P. testosteroni* CIP 5924 (ATCC 11996). L'analyse comparative de la teneur en phosphore entre les LPS de *P. testosteroni* 871204 et ceux de *P. cepacia* 871101 montre une grande hétérogénéité intra et inter-espèce.

Nos résultats font apparaître une teneur en phosphore généralement plus importante pour l'espèce *testosteroni* que pour l'espèce *cepacia*. Nous ne pouvons pas généraliser cette observation, notre étude étant réalisée sur un nombre de cas trop faible.

Ces différences observées chez diverses souches bactériennes pourraient s'expliquer par des variations de phosphorylation au niveau du lipide A ou du core.

Une étude par résonance magnétique nucléaire du ^{31}P doit nous permettre d'identifier les groupements phosphate au sein de la molécule de LPS. (Cf. chapitre 4-1-4).

4-1-1-5 Dosage des acides uroniques :

Pour la souche *P. cepacia* 871101, le dosage des acides uroniques a été effectué uniquement sur le LPS II. La teneur moyenne de ce LPS est de 0,73%.

Pour *P. testosteroni* 871204, le LPS I possède une teneur en acides uroniques de 2,47%, qui n'est pas retrouvée pour le LPS II puisqu'il n'en renferme que 0,31%. Cette différence nous paraît inexplicable pour l'instant.

Nous avons en outre réalisé ce dosage pour les LPS de la souche de référence *P. cepacia* CIP 8024. Les résultats obtenus indiquent des teneurs assez faibles, avec respectivement, 0,21% pour les LPS I et 0,14% pour les LPS II.

Nous avons recensé dans l'Étude Bibliographique de ce travail, les différents acides uroniques susceptibles d'être rencontrés dans les LPS de *Pseudomonas*. Toutefois les auteurs qui ont mis en évidence ces acides uroniques ne donnent pas d'indication quant à la proportion relative qu'ils représentent.

4-1-2-Analyse par chromatographie en phase gazeuse des oses neutres et des acides gras

4-1-2-1 Analyse des oses neutres

L'analyse des oses neutres présents dans les LPS est effectuée après hydrolyse par HCl 0,1N pendant 48h à + 100°C, puis dérivation des sucres sous la forme d'acétates d'alditols. Les sucres sont identifiés par chromatographie en phase gazeuse en fonction de leur temps de rétention par rapport à celui de sucres témoins. Le L-glycéro-D-mannoheptose a été identifié par rapport au LPS de *Yersinia pestis* EV40 étudié par BORDET [BORDET et coll., 1977].

Les chromatogrammes sont représentés sur les Figures 29 a,b,c,d, et les résultats réunis dans les Tableaux 12 a et 12 b et les Figures 29 e et 29 f.

Les LPS I et II de *P. cepacia* 871101 (Figures 29 a et 29 b) renferment tous les deux du rhamnose (pic 1), du glucose (pic 4) et le L-glycéro-D-mannoheptose (pic 7). Le LPS II renferme de plus des traces de ribose (pic 3) qui peuvent traduire la présence de résidus d'acides nucléiques et des traces de mannose. Les résultats de l'étude des abondances relatives des oses neutres sont montrés dans le Tableau 12 a et la Figure 29e.

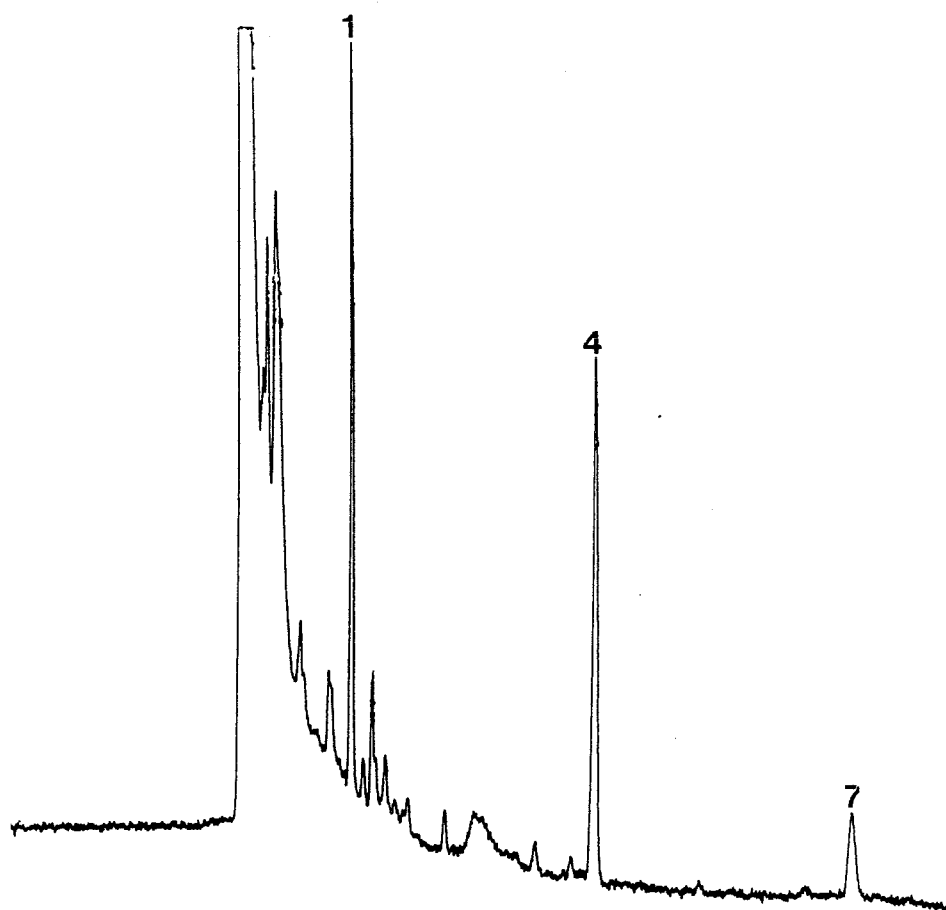


Figure 29 a : Chromatogramme des acétates d'alditols des oses du LPS I de *P. cepacia* 871101.

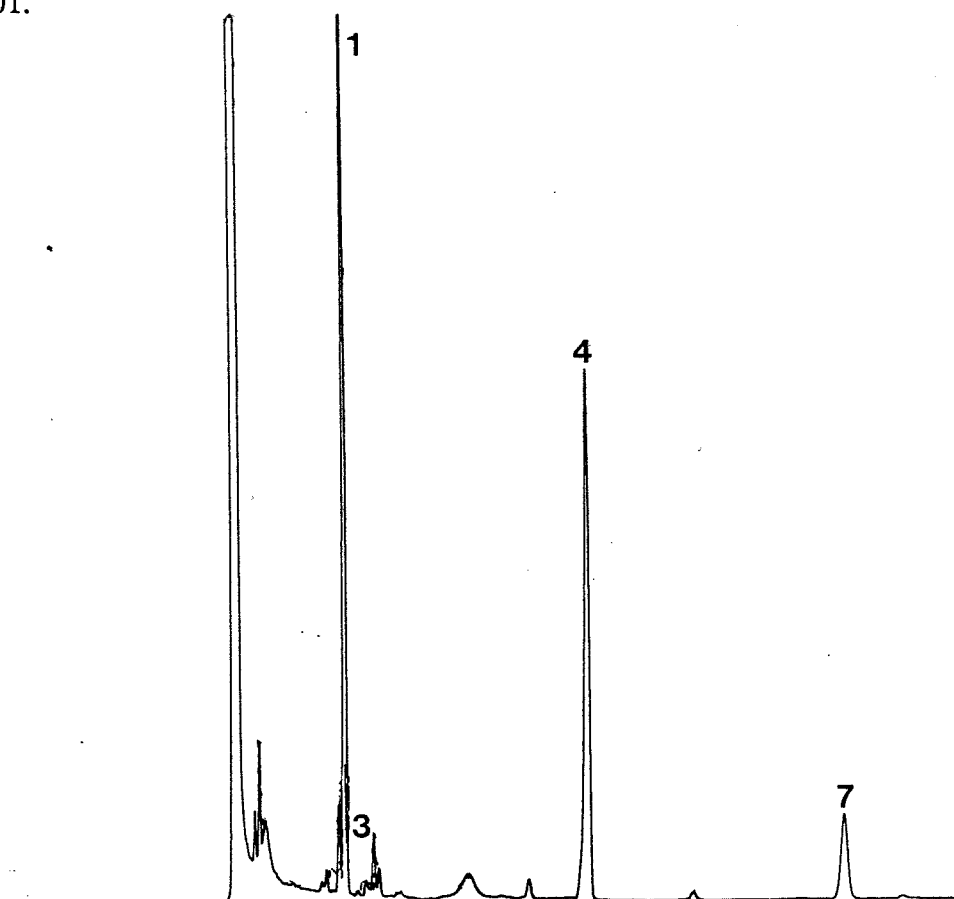


Figure 29 b : Chromatogramme des acétates d'alditols des oses du LPS II de *P. cepacia* 871101.

ECHANTILLONS	OSes	Rhamnose	Fucose	Ribose	Mannose	Glucose	Heptose	Total
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS I	Tps rétention Aire	3,47 11401				5,95 14066	8,58 3521	2898
	Abondance relative	39,33 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	48,52 %	12,15 %	100 %
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS II	Tps rétention Aire	3,48 313043		3,83 7497	5,37 8811	5,96 232165	8,59 55842	30,55 137928
	Abondance relative	50,71 %	0,00 %	1,21 %	1,43 %	37,61 %	9,05 %	100,00 %

Tableau 12 a : Temps de rétention et abondances relatives des acétates d'alditols des LPS I et II de *P. cepacia* 871101.

Abondance relative (%)

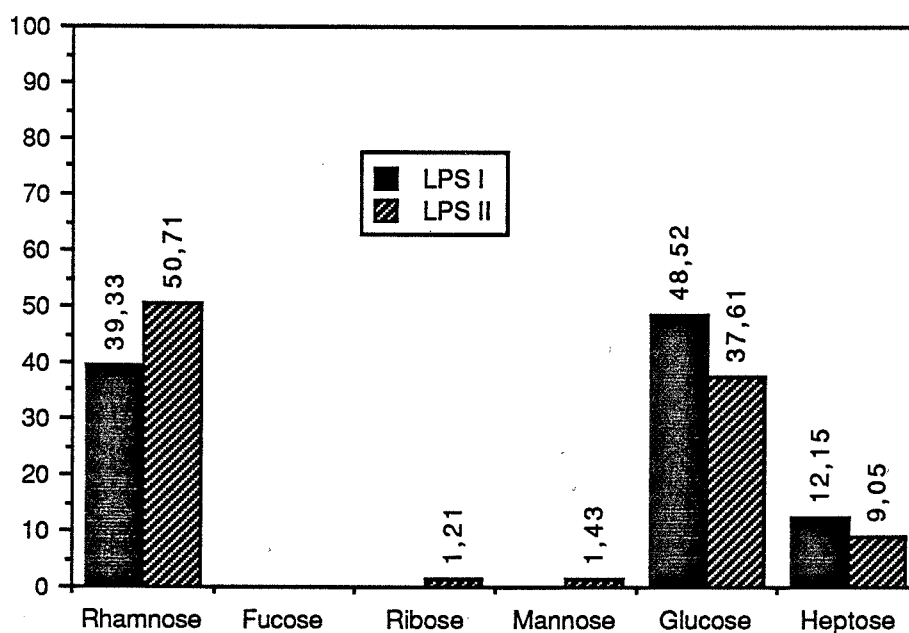


Figure 29 e : Comparaison des abondances relatives des acétates d'alditols des LPS I et II de *P. cepacia* 871101.

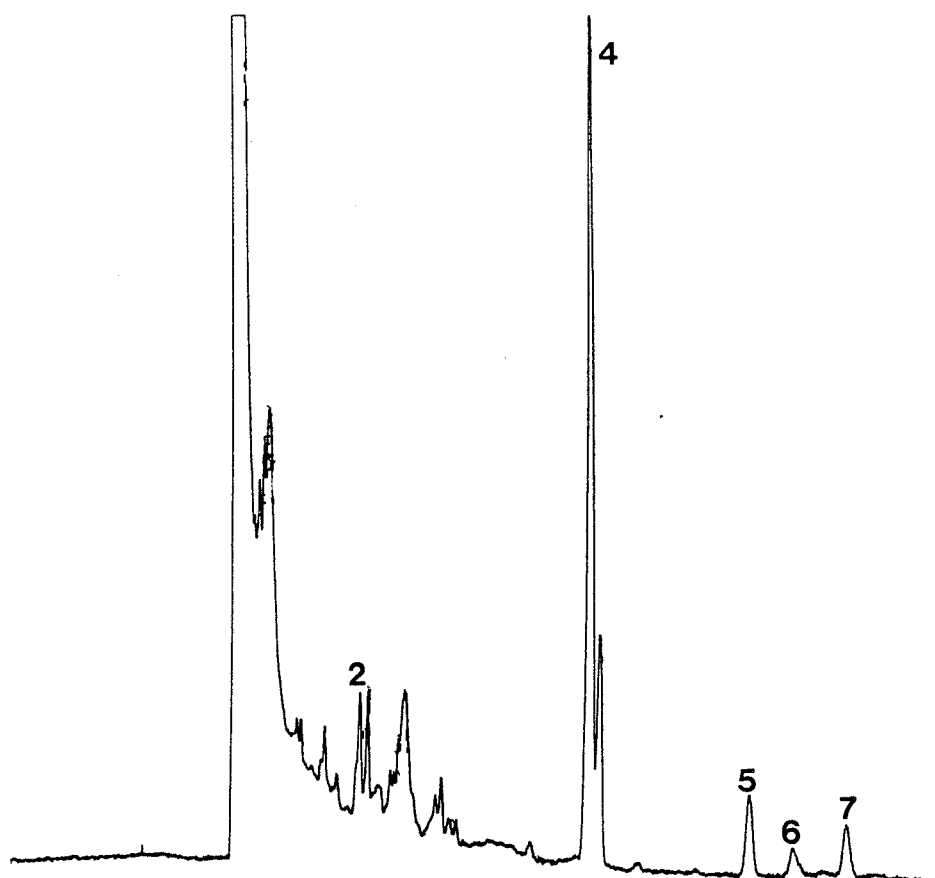


Figure 29 c : Chromatogramme des acétates d'alditols des oses du LPS I de *P. testosteroni* 871204.

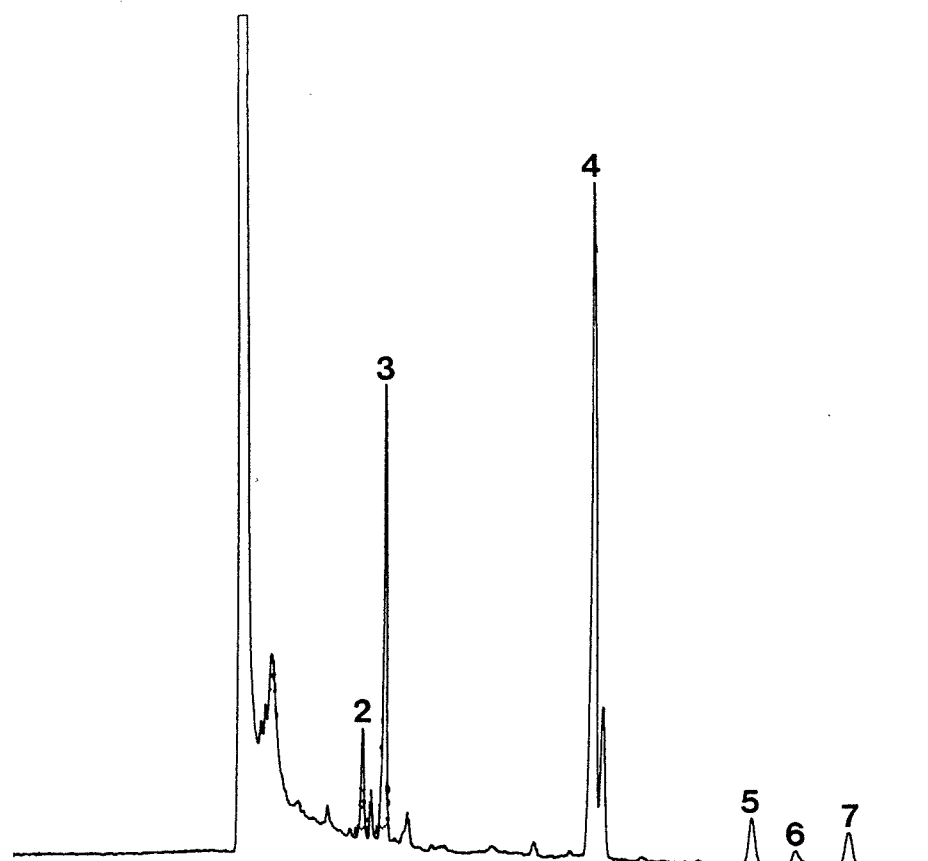


Figure 29 d : Chromatogramme des acétates d'alditols des oses du LPS II de *P. testosteroni* 871204.

ECHANTILLONS	OSes	Rhamnose	Fucose	Ribose	Mannose	Glucose	Heptose	Total
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS I	Tps rétention Aire		3,59 8247	3,82 33212		5,94/6,04 94628	8,55 5338	141425
	Abondance relative	0,00 %	5,83 %	23,48 %	0,00 %	66,91 %	3,77 %	100 %
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS II	Tps rétention Aire		3,60 5279			5,94/6,03 67728	8,55 4126	77133
	Abondance relative	0,00 %	6,84 %	0,00 %	0,00 %	87,81 %	5,35 %	100,00 %

Tableau 12 b : Temps de rétention et abondances relatives des acétates d'alditols des LPS I et II de *P. testosteroni* 871204.

Abondance relative (%)

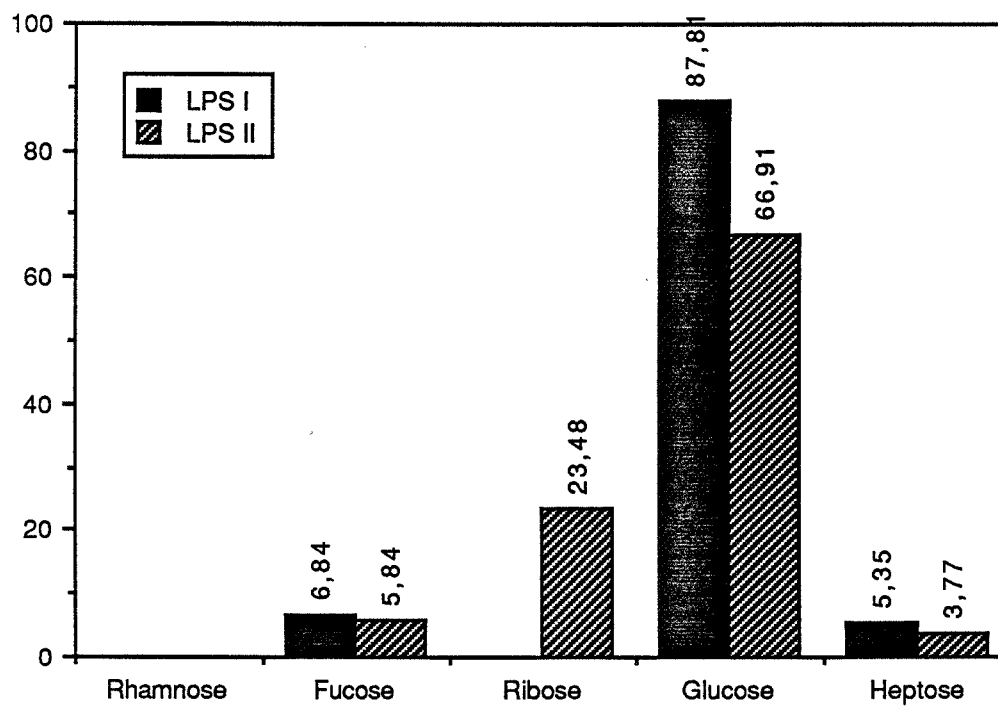


Figure 29 f : Comparaison des abondances relatives des acétates d'alditols des LPS I et II de *P. testosteroni* 871204.

Pour les LPS I et II de *P. testosteroni* 871204 (Figures 29 c et 29 d) nous remarquons une absence de rhamnose, et la présence de fucose (pic 2), de glucose (pic 4) et de L-glycéro-D-mannoheptose (pic 7). Deux autres pics (pics 5 et 6) sont présents entre le pic du glucose et celui du L-glycéro-D-mannoheptose, ils traduisent la présence d'autres sucres (probablement des heptoses), ou de produits de dégradation du L-glycéro-D-mannoheptose. Les résultats de l'étude des abondances relatives des oses neutres sont montrés dans le Tableau 12 b et la Figure 29 f.

La présence de 23,4% de ribose (pic 3) dans le LPS II fait suspecter une forte contamination par les acides nucléiques qui n'est pourtant pas révélée par le spectre UV. Des essais sont en cours pour tenter d'expliquer ce phénomène.

Il existe de légères différences d'abondances relatives entre les LPS I et II pour chacune des souches mais celles-ci ne sont pas significatives.

Nous avons souligné au cours de l'étude bibliographique que le rhamnose, le glucose et l'heptose sont des sucres très fréquents dans les LPS de *Pseudomonas*. Nos résultats concernant les LPS de *P. cepacia* 871101 rejoignent les données de la littérature.

En revanche, le LPS de *P. testosteroni* 871204 présente deux particularités, une absence totale de rhamnose d'une part et la présence de fucose, qui est un sucre inhabituel des LPS de *Pseudomonas*, mais que l'on retrouve néanmoins chez d'autres espèces bactériennes : *Xanthomonas*, *Rhizobium*,...[WILKINSON, 1977a].

4-1-2-2 Analyse des acides gras

Les acides gras présents dans les LPS sont libérés après hydrolyse des lipopolysaccharides par HCl 4N pendant 4 heures à + 100°C. Après transformation sous la forme d'esters méthyliques par le diazométhane gazeux, les acides gras méthylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats sont présentés sur les Figures 30 a-f, et dans les Tableaux 13 a et 13 b.

Les LPS I et II de *P. cepacia* 871101 (Figure 30 a,b) contiennent de l'acide dodécanoïque (C_{12:0}, pic 1), une très large majorité d'acide hydroxydodécanoïque (C_{12:0} OH, pic 2), de l'acide tétradécanoïque (C_{14:0}, pic 3), de l'acide hydroxytétradécanoïque (C_{14:0} OH, pic 4), de l'acide hexadécanoïque (C_{16:0}, pic 5), de l'acide hydroxyhexadécanoïque (C_{16:0} OH, pic 6) et de l'acide octadécanoïque (C_{18:0}, pic 7). Les abondances relatives de chaque acide gras sont reportées dans le Tableau 13 a

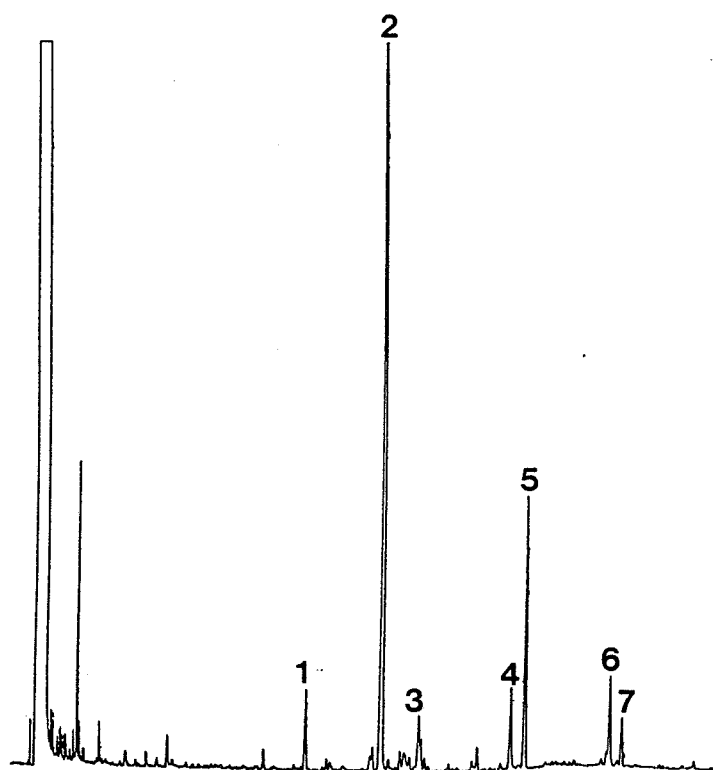


Figure 30 a : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du LPS I de *P. cepacia* 871101.

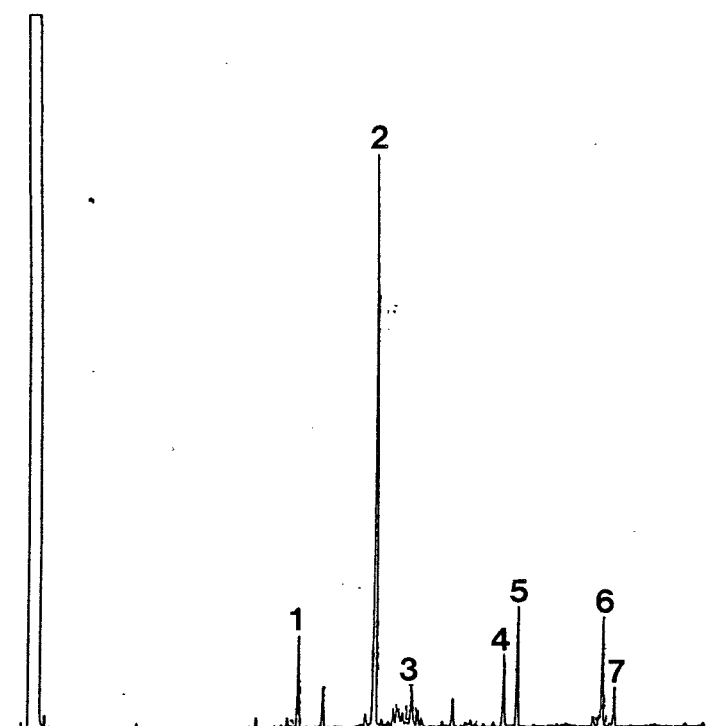


Figure 30 b : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du LPS II de *P. cepacia* 871101.

ECHANTILLONS	ACIDES GRAS	C 12	C 12:0 OH(3)	C 14	C 14:0 OH	C 16	C 16:0 OH	C 18	Total
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS I	Tps rétention	14,7	18,52	20,36	24,97	25,65	29,93	30,53	2017290
	Aire	63231	1457947	67977	77824	238650	68393	43268	
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS II	Abondance relative	3,13 %	72,27 %	3,37 %	3,86 %	11,83 %	3,39 %	2,14 %	100,00 %
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS II	Tps rétention	14,7	18,55	20,37	24,99	25,67	29,94	30,55	4262373
	Aire	310595	2537699	164433	269365	441598	400755	137928	
<i>Pseudomonas cepacia</i> 871101 LPS II	Abondance relative	7,29 %	59,54 %	3,86 %	6,32 %	10,36 %	9,40 %	3,24 %	100,00 %

Tableau 13 a : Temps de rétention et abondances relatives des esters méthyliques d'acides gras des LPS I et II de *P. cepacia* 871101.

Abondance relative (%)

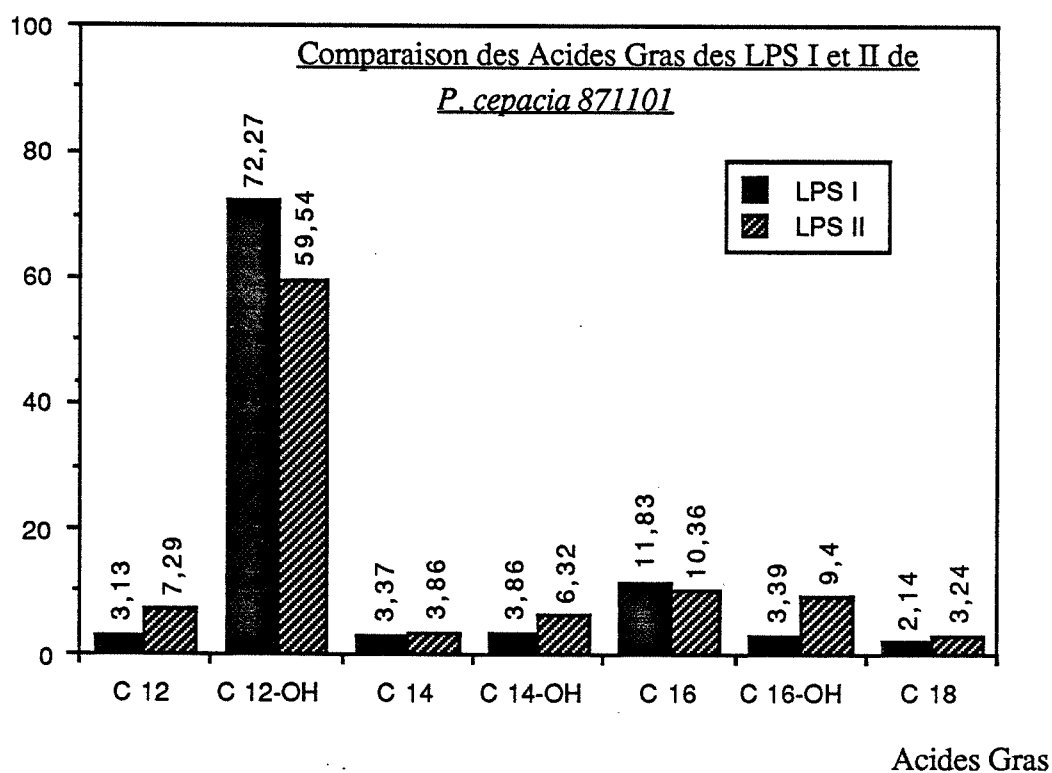


Figure 30 e : Comparaison des abondances relatives des esters méthyliques d'acides gras des LPS I et II de *P. cepacia* 871101.

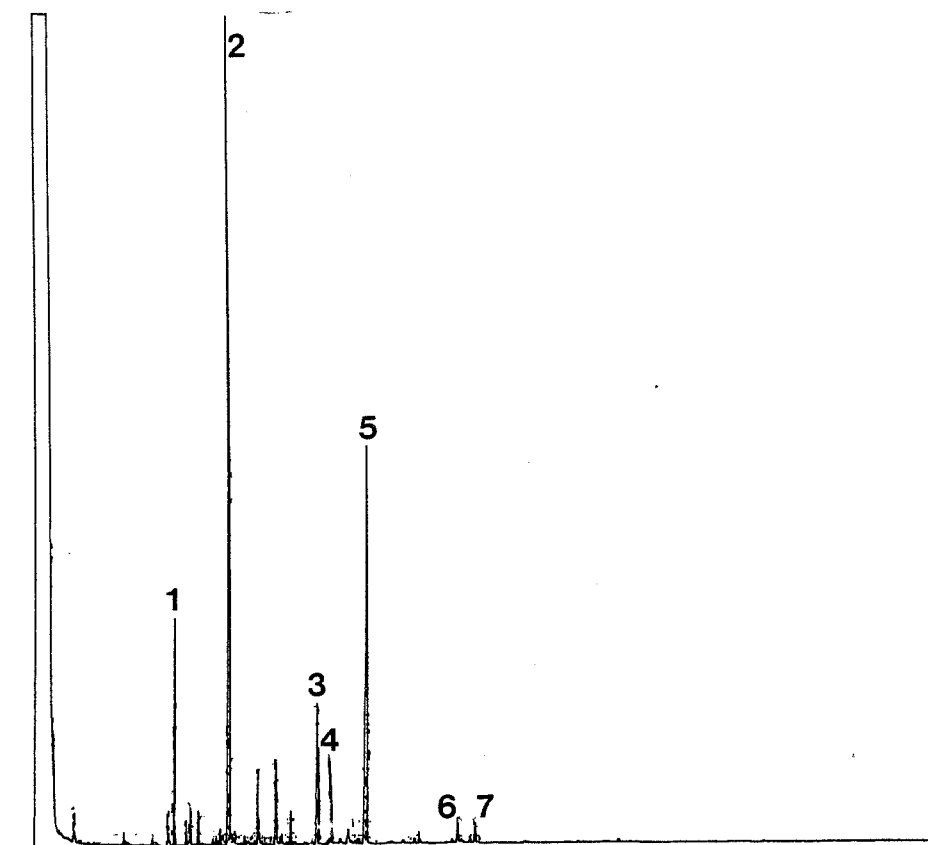


Figure 30 c : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du LPS I de *P. testosteroni* 871204.

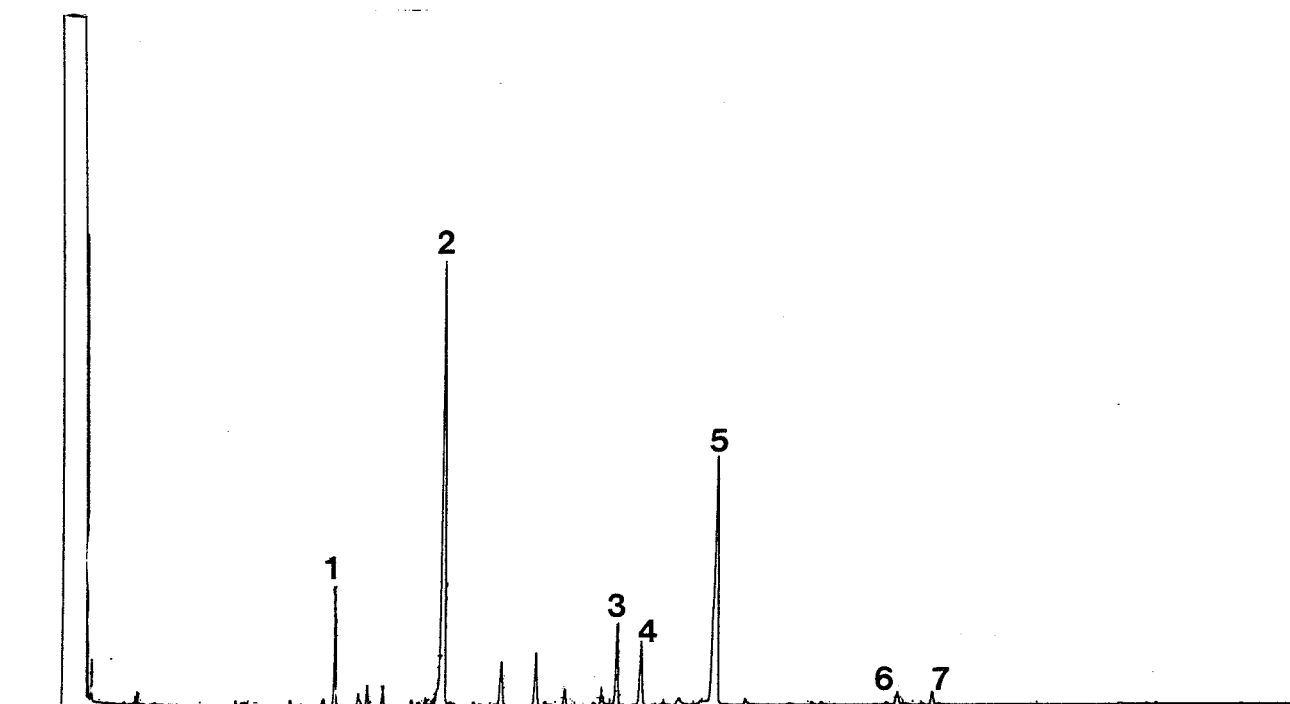


Figure 30 d : Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras du LPS II de *P. testosteroni* 871204.

Remarque : L'échelle de temps est dilatée deux fois pour le chromatogramme de la Figure 30 d.

ECHANTILLONS	ACIDES GRAS	C 12	C 12:0 OH(3)	C 14	C 14:0 OH	C 16	C 16:0 OH	C 18	Total
<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204 LPS I	Tps rétention Aire	14,77 6945367	18,73 1,2E+07	20,36 977897	24,02 1009006	25,73 5345422	29,78 187096	30,55 439819	26904607
	Abondance relative	26,04 %	44,11 %	3,67 %	3,78 %	20,04 %	0,70 %	1,65 %	100,00 %
<i>Pseudomonas testosteroni</i> 871204 LPS II	Tps rétention Aire	14,72 694754	18,58 3123683	20,37 290716	23,99 197005	25,67 498894	29,79 38520	30,55 152349	4995921
	Abondance relative	13,91 %	62,52 %	5,82 %	3,94 %	9,99 %	0,77 %	3,05 %	100,00 %

Tableau 13 b : Temps de rétention et abondances relatives des esters méthyliques d'acides gras des LPS I et II de *P. testosteroni* 871204.

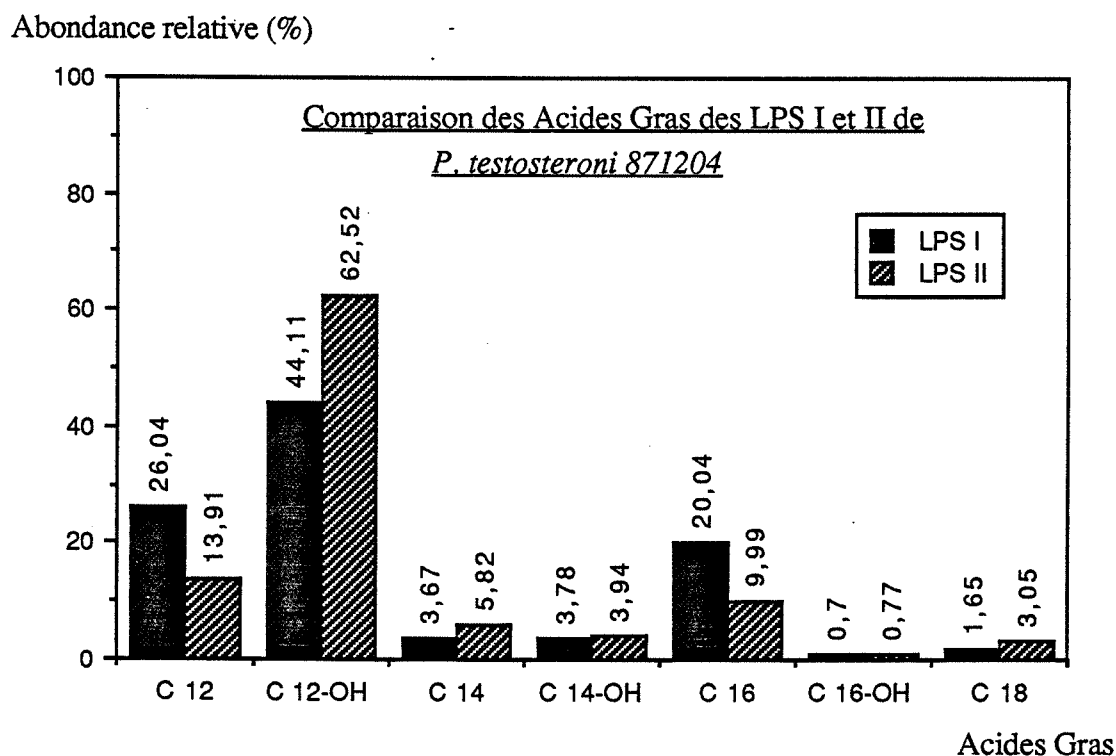


Figure 30 f : Comparaison des abondances relatives des esters méthyliques d'acides gras des LPS I et II de *P. testosteroni* 871204.

et sur la Figure 30 e. L'analyse de ces résultats montre une très grande similitude dans les pourcentages respectifs des acides gras entre les deux types de LPS.

Les LPS I et II de *P. testosteroni* 871204 (Figure 30 c, d) contiennent les mêmes acides gras que ceux de *P. cepacia* 871101. Les abondances relatives de chaque acide gras sont reportées dans le Tableau 13 b et Figure 30 f

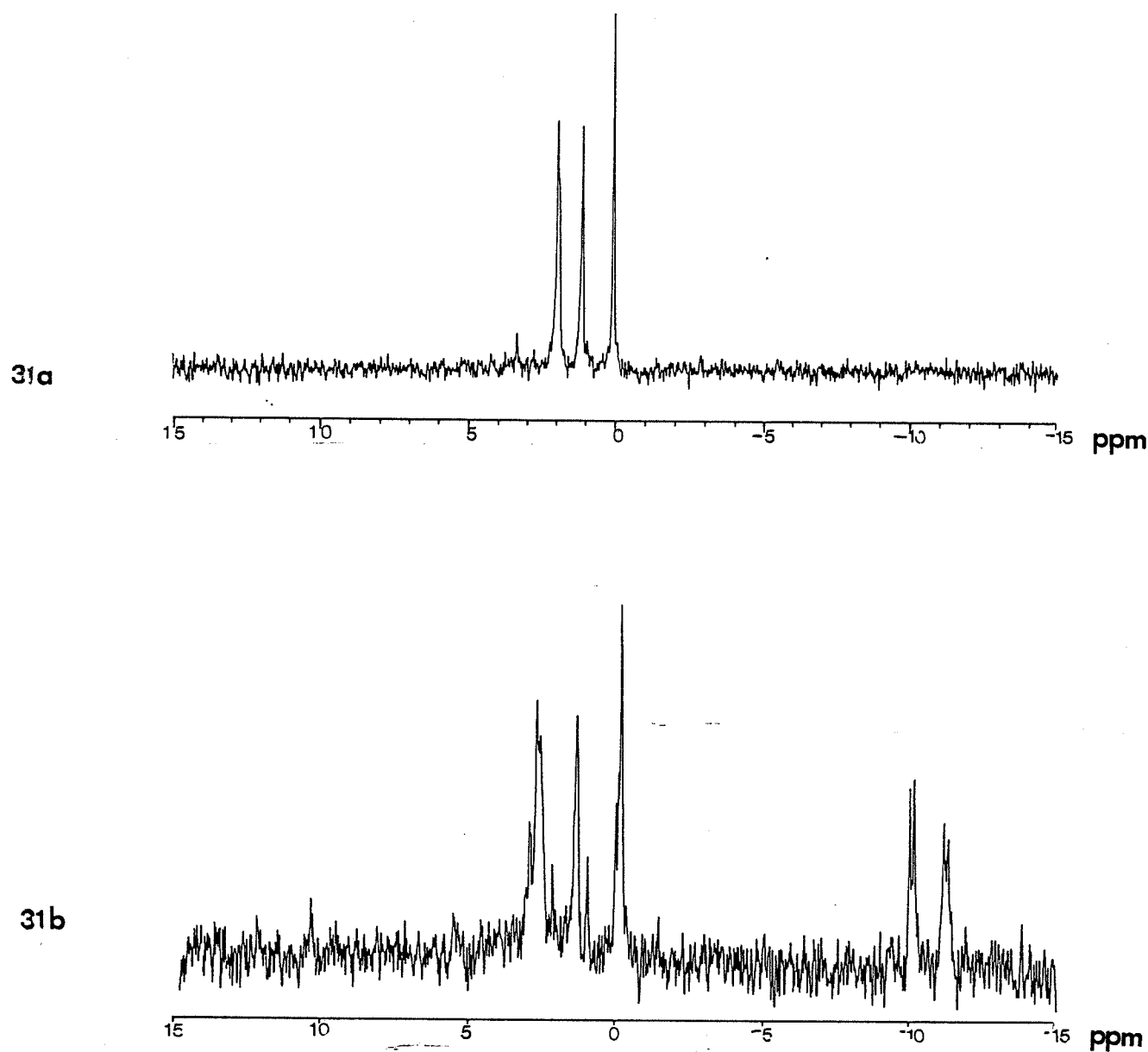
Nos résultats montrent que pour l'ensemble des LPS testés, l'acide gras majoritaire est un acide gras hydroxylé : l'acide hydroxydodécanoïque, appelé également acide hydroxylaurique : (C_{12:0} OH). La Figure 30 g nous donne son spectre de masse et nous indique que la fonction hydroxyle est portée par le carbone n° 3, du fait du pic majoritaire observé pour un m/z de 103. Il s'agit donc de l'acide β-hydroxylaurique.

Des résultats similaires ont été obtenus pour des LPS d'autres souches de *P. cepacia* et de *P. testosteroni* isolées de bains dialyse qui ont été analysés au laboratoire.

Une partie de nos résultats est en accord avec ceux de la littérature [WILKINSON et coll., 1973, WILKINSON, 1977a] et confirme que chez les *Pseudomonas*, l'acide gras hydroxylé dominant est l'acide hydroxylaurique. Ce résultat permet de distinguer les *Pseudomonas* des Entérobactéries, dont les LPS sont les plus étudiés, et pour lesquels l'acide gras hydroxylé majeur est l'acide hydroxytétradécanoïque ou acide hydroxymyristique (C_{14:0} OH), qui représente un véritable marqueur de ces LPS. Certaines souches de *Pseudomonas* peuvent contenir tout de même de faibles quantités d'acide hydroxymyristique.

Toutefois certains de nos résultats divergent de ceux réunis dans le Tableau 5 [WILKINSON et coll., 1973], qui indiquent d'une part que les LPS de l'espèce *cepacia* contiennent l'acide β-hydroxymyristique (C_{14:0} OH) et les acides α et β-hydroxyhexadécanoïque (C_{16:0} OH(2) et C_{16:0} OH(3)), la détermination des acides gras non hydroxylés n'étant pas rapportée, et d'autre part que l'acide gras hydroxylé de l'espèce *testosteroni* est l'acide β-hydroxydodécanoïque (C_{10:0} OH(3)) que nous ne retrouvons pas au cours de notre analyse. Le Tableau 5 indique également la présence d'acide α-hydroxylaurique (C_{12:0} OH(2)) dans le LPS de certaines espèces de *Pseudomonas*. Nous ne l'avons pas retrouvé dans les LPS des deux souches testées.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la structure du lipide A ou sa composition en acides gras pouvaient expliquer les différences d'activité biologique inter-espèces [PIER et coll., 1981, BRADE et coll., 1988, LOPPNOW et coll., 1989].



Figures 31 a et b : Analyse des groupements phosphate présents dans le LPS I de *P.testosteroni* 871204 (31a) et le LPS II de *P.cepacia* 871101 (31b), par résonance magnétique nucléaire du ^{31}P . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

Notre étude ne conforte pas cette hypothèse. En effet, nous observons des différences d'activité biologique entre les LPS I et II d'une même souche bactérienne à la fois pour le test LAL et pour le test IL-1, sans qu'il y ait de différence significative de leur composition en acides gras.

Il est donc vraisemblable que d'autres constituants du LPS sont responsables des variations d'activité spécifique observées pour les divers tests d'activité biologique.

4-1-3 Analyse des groupements phosphate présents dans le LPS par résonance magnétique nucléaire du phosphore : ^{31}P .

Les spectres obtenus sont reportés sur les Figures 31a et 31b respectivement pour le LPS I de *P. testosteroni* 871204 et le LPS II de *P. cepacia* 871101.

La Figure 31a montre trois signaux dont les déplacements chimiques sont situés entre 0 ppm et +2 ppm, qui indiquent la présence de trois groupements phosphate(s) ou phosphodiester(s) situés précisément à : +0,02 ppm, +1,08 ppm et + 1,94 ppm. Un quatrième signal est présent à l'état de trace à la position +3,34 ppm.

La Figure 31b montre trois signaux situés entre les positions, - 0,2 ppm et +3 ppm. Le pic à - 0,2 ppm indique probablement la présence d'un groupement phosphodiester, alors que les signaux à + 1,29 ppm et + 2,69 ppm sont dus probablement à deux groupements phosphate distincts.

Nous observons également un ensemble de quatre signaux symétriques 2 à 2 entre les positions - 10 ppm et - 11,5 ppm. Cette image est typique d'un couplage entre deux atomes de ^{31}P qui correspond donc à la présence d'un groupement pyrophosphate identifié comme un pyrophosphodiester.

4-2 CONCLUSION DE LA CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES LPS

Les résultats obtenus pour les LPS I et LPS II sont très semblables pour l'ensemble des dosages colorimétriques que nous avons effectués à l'exception du dosage des acides uroniques dans les LPS I et II de *P. testosteroni* 871204. Ils indiquent que les deux techniques d'extraction que nous avons utilisées conduisent à l'obtention de LPS équivalents en terme moléculaire. Ces résultats sont confortés par ceux obtenus en

électrophorèse en gel de polyacrylamide (DOC-PAGE) présentés au paragraphe 3 où il apparaît que les LPS I et II présentent le même profil électrophorétique.

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse des acétates d'alditols et des esters méthyliques d'acides gras confirment également l'ensemble de ces observations car les résultats obtenus pour les LPS I et II de chacune des souches sont très semblables.

Une confirmation supplémentaire pourrait être apportée grâce à l'analyse par électrophorèse capillaire, qui permet de quantifier chacune des bandes obtenues en DOC-PAGE, et qui nous renseignerait donc sur la proportion relative de chacune d'elles dans les LPS I et II.

Nos résultats permettent de dégager certaines particularités des LPS étudiés :

- la teneur en KDO est très variable selon les espèces et selon les souches d'une même espèce ce qui semble indiquer que la partie "core" n'est pas aussi constante au sein du genre *Pseudomonas* que pour les différents genres bactériens qui composent la famille des Entérobactéries,

- la quantité de glucosamine varie également selon l'espèce et selon la souche, ce qui traduit la présence d'oses aminés au niveau de la chaîne polysaccharidique de certains LPS susceptibles d'interférer dans le dosage,

- la composition en oses neutres des LPS de *P. cepacia* 871101 rejoint les données de la littérature en revanche, la souche 871204 de *P. testosteroni* présente deux particularités, une absence totale de rhamnose et la présence de fucose qui est un sucre inhabituel des LPS de *Pseudomonas*,

- nous avons trouvé la présence d'acide gras β -hydroxylé de type β -hydroxylaurique ($C_{12:0}$ OH(3)), différent de celui retrouvé dans les LPS des Entérobactéries,

- l'analyse des groupements phosphate par RMN du ^{31}P fait apparaître des différences entre les LPS des deux souches testées.

5 - ANALYSE DES LIPOPOLYSACCHARIDES PAR CHROMATOGRAPHIE FPLC® ET ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE.

Nous avons cherché à séparer les formes R des formes S pour chacune des souches dans le but de mieux les caractériser.

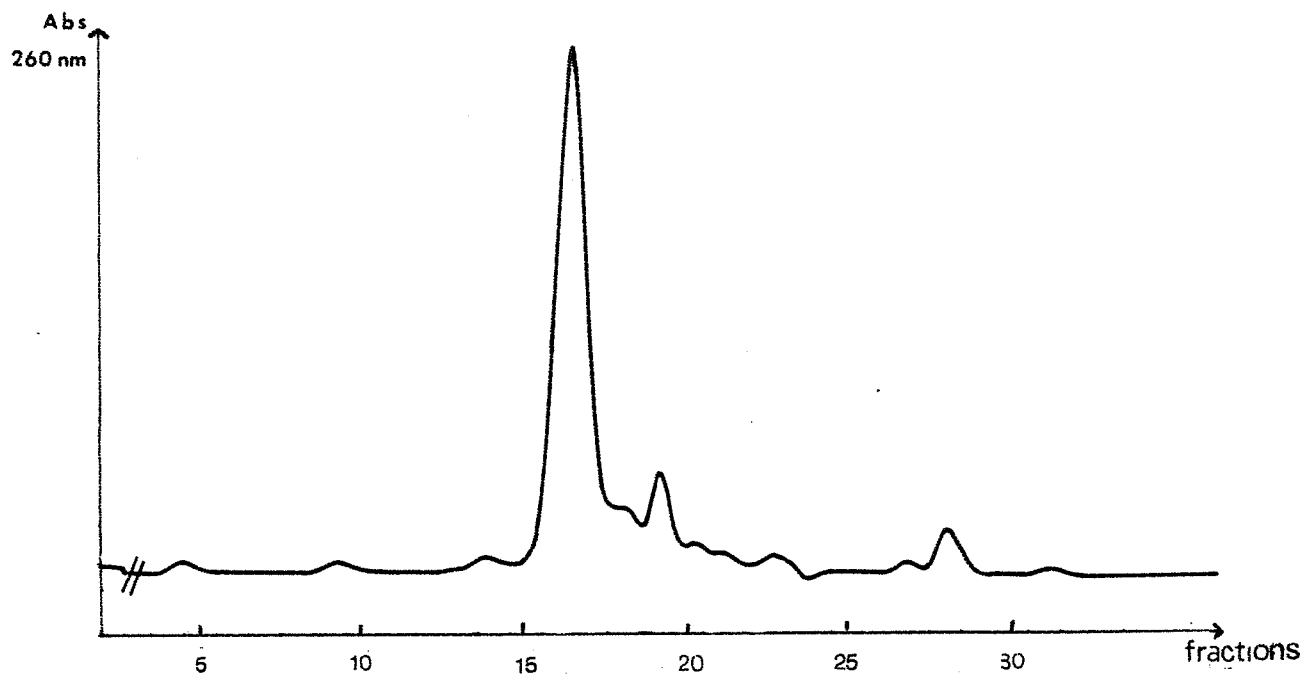


Figure 32 a : Diagramme d'élution sur colonne Superose 12 du LPS II de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma)

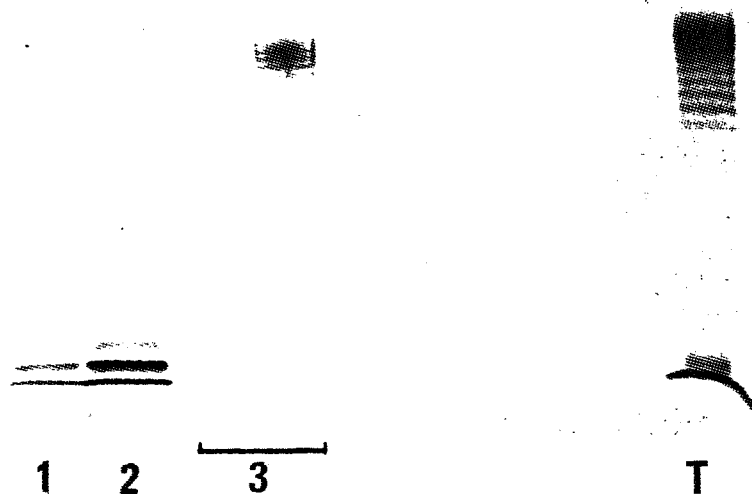


Figure 32 b : Analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des fractions éluées de la colonne Superose 12 après séparation du LPS II de *Escherichia coli* O111:B4.

<u>Piste 1 :</u>	LPS de forme R
<u>Piste 2 :</u>	LPS de forme R + SR
<u>Piste 3 :</u>	LPS de forme S
<u>Piste T :</u>	LPS II de <i>Escherichia coli</i> O111:B4 Témoin.

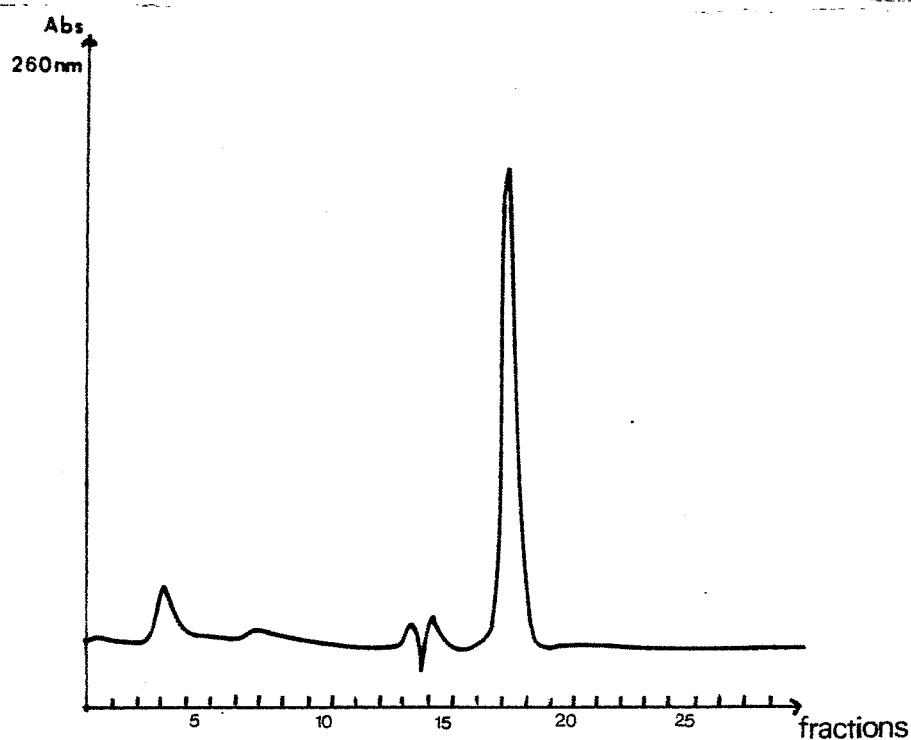


Figure 32 c : Diagramme d'élution sur colonne Superose 12 du LPS II de *P. cepacia* 871101

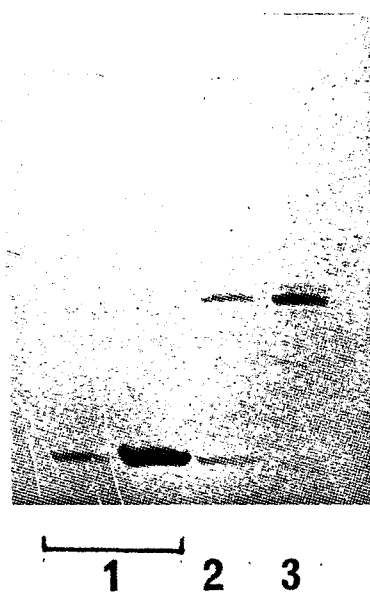


Figure 32 d : Analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des fractions élues de la colonne Superose 12 après séparation du LPS II de *P. cepacia* 871101

<u>Piste 1 :</u>	LPS de forme R
<u>Piste 2 :</u>	LPS de forme R + S (mélange)
<u>Piste 3 :</u>	LPS de forme S

5-1 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE FPLC® DES LPS DE *P. cepacia* 871101

La séparation des LPS par chromatographie pose un problème majeur qui réside dans la dissociation des molécules. En effet, compte tenu de leur caractère amphiphile, les LPS ont tendance à s'associer en micelles. Pour obtenir une bonne séparation il faut donc ajouter des détergents de type ionique dans la phase mobile. Nous avons utilisé dans notre étude le tampon décrit par PETERSON, [PETERSON et coll.,1985].

L'utilisation d'une colonne FPLC® de type Superose 12 (Pharmacia, Suède) permet d'améliorer la résolution, tout en diminuant le temps de séparation. La densité optique de l'éluant est mesurée à 260 nm, bien que les LPS absorbent très peu à cette longueur d'onde. A des longueurs d'ondes inférieures, plus favorables à la détection des LPS, le tampon utilisé comme phase mobile absorbe de lui-même et rend le détecteur inopérant.

Les fractions éluées sont ensuite testées par électrophorèse afin d'apprécier la séparation des formes R et des formes S. Nous avons effectué des essais préliminaires avec des LPS commerciaux d'*Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma) extraits par le phénol à chaud. Ils nous ont donné les résultats indiqués Figure 32 a, b. Nous obtenons le LPS de forme R isolé (Piste 1), un mélange des formes R et SR (Piste 2) et le LPS de forme S isolé (Piste 3).

Nous avons obtenu des résultats similaires pour le LPS II de *P. cepacia* 871101, comme l'indiquent les Figures 32c, d. La fraction 15 (Piste 3) renferme uniquement les LPS de forme S; les fractions 17 et 18 (Piste 1) contiennent les LPS de forme R. La fraction 16 (Piste 2) contient encore un mélange des deux formes.

Nous remarquons que le LPS de forme R semble absorber plus à 260 nm que le LPS de forme S, à moins qu'il ne soit présent en plus grande proportion dans les deux LPS testés.

Nous pouvons conclure que cette technique est bien adaptée à la séparation des LPS de type S et des LPS de type R à condition que ceux-ci aient des masses moléculaires suffisamment éloignées. L'utilisation de cette technique n'est donc pas généralisable à l'ensemble des LPS, car les LPS de *P. testosteroni* 871204 par exemple ne sont pas séparés par cette technique.

Nous avons alors mis au point une technique de séparation des LPS plus résolutive.

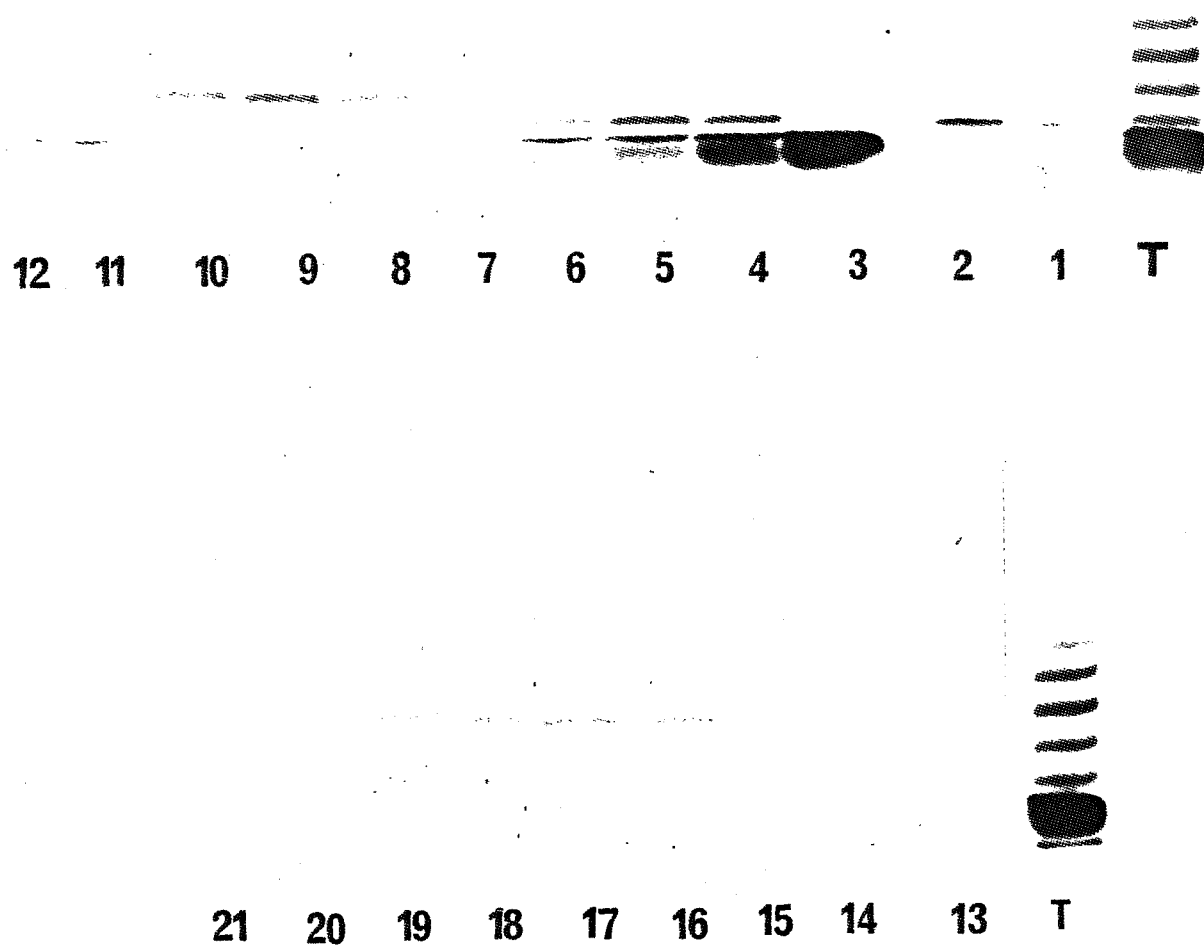


Figure 33 : Analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des fractions éluées du gel d'électrophorèse préparative du LPS I de *P. testosteroni* 871204. Les fractions éluées ont toutes un volume d'environ 1 ml.

- | | |
|-------------------------|---|
| <u>Pistes 1, 2, 3 :</u> | LPS de forme R isolés |
| <u>Pistes 4, 5, 6 :</u> | LPS de forme R et SR |
| <u>Pistes 7 à 12 :</u> | LPS de forme S (avec deux sous-unités O-spécifiques) |
| <u>Pistes 14 à 21 :</u> | LPS de forme S (avec trois sous-unités O-spécifiques) |
| <u>Piste T :</u> | LPS I de <i>P. testosteroni</i> 871204 (Témoin). |

5 - 2 ANALYSE DES LPS DE *P. testosteroni* PAR ÉLECTROPHORÈSE PRÉPARATIVE

Cette technique est basée sur une séparation électrophorétique des LPS au cours de laquelle les différentes bandes sont éluées sélectivement après séparation. Les fractions sont ensuite testées par électrophorèse analytique.

Les résultats sont indiqués dans la Figure 33.

Cette méthode d'analyse est extrêmement résolutive, elle permet de séparer les LPS de forme R (Pistes 1 à 3), des LPS de forme S possédant deux sous-unités O-spécifiques (Pistes 7 à 12), des LPS de forme S possédant trois sous-unités O-spécifiques (Pistes 14 à 21) etc... En effet, nous avons pu observer les bandes correspondant aux LPS de forme S possédant quatre sous-unités O-spécifiques mais avec une très faible intensité.

Cette technique apporte des perspectives nouvelles dans l'analyse biochimique des LPS. Jusqu'à présent, les connaissances sur une portion précise de la molécule se faisait soit après hydrolyse partielle de la molécule, soit à l'aide de bactéries mutantes ayant perdu la capacité de fixer l'un de ses constituants. L'analyse de plusieurs mutants permet de reconstruire la structure complète du LPS.

Grâce à la technique que nous avons développée, une partie de ces expériences peut être remplacée par une analyse directe de chacune des fractions obtenues à partir de LPS issus d'une même bactérie et provenant de la même extraction.

6 - MESURE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES LPS

Nous avons retenu deux tests différents d'évaluation de l'activité biologique en fonction d'une part de leur spécificité et d'autre part de leur sensibilité.

6-1 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DES LPS VIS-À-VIS DU TEST LAL CHROMOGÉNIQUE :

Le test LAL, même s'il n'est pas le test officiel de la Pharmacopée Française, est une technique très utilisée pour la recherche de substance pyrogène, et plus particulièrement des LPS, dans les solutés injectables. Ce test est donc bien adapté pour évaluer l'activité endotoxinique des LPS.

BACTÉRIES	ACTIVITÉ LAL en UE.ng ⁻¹
<i>P.cepacia</i> 871101 LPS I (Galanos)	4
LPS II (Westphal)	1
<i>P. testosteroni</i> 871204 LPS I (Galanos)	44
LPS II (Westphal)	23
<i>P.cepacia</i> CIP 8024 LPS I (Galanos)	5
(ATCC 25416) LPS II (Westphal)	5,4
<i>P.testosteroni</i> CIP 5924 LPS I (Galanos)	5,6
(ATCC 11996) LPS II (Westphal)	5,4

UE = Unité d'Endotoxine estimée par rapport à l'Endotoxine de référence de *Escherichia coli* O111:B4

Tableau 14 : Activité LAL des LPS I et II des deux souches isolées *P. cepacia* 871101 et *P. testosteroni* 871204 et de deux souches de référence *P. cepacia* CIP 8024 et *P.testosteroni* CIP 5924

Nous avons utilisé le test LAL chromogénique, qui permet un dosage qualitatif de l'activité endotoxinique des LPS, exprimée en unité d'endotoxine par nanogramme ($\text{UE} \cdot \text{ng}^{-1}$) en prenant l'endotoxine d'*Escherichia coli* O111 : B4 comme référence.

Les résultats présentés dans le Tableau 14 indiquent que le LPS I de *P. cepacia* 871101 est 4 fois plus actif que le LPS II. Cette observation est retrouvée pour *P. testosteroni* mais dans une proportion moindre, le rapport n'étant plus que de 2.

Nos résultats font apparaître une grande différence de réactivité entre les LPS de *P. testosteroni* 871204 et ceux de *P. cepacia* 871101. On peut en effet constater que l'activité spécifique du LPS I de *P. testosteroni* est 11 fois plus grande que celle du LPS I de *P. cepacia* 871101; cette différence est encore plus marquée pour les LPS II (23 fois).

Nous avons également déterminé l'activité endotoxinique des LPS des souches de *P. cepacia* CIP 8024 (ATCC 25416) et *P. testosteroni* CIP 5924 (ATCC 11996), celles-ci sont également reportées dans le Tableau 14.

Nous obtenons la même activité spécifique pour les LPS I et II de chacune des souches. Les LPS de *P. cepacia* CIP 8024 et de *P. testosteroni* CIP 5924 ont des activités spécifiques similaires

L'ensemble de ces observations permet de dégager les points suivants :

- Les activités spécifiques des LPS I et II de *P. testosteroni* CIP 5924 sont plus faibles que celle du LPS de *E. coli* O111 : B4 pris en référence, qui est de $10 \text{ UE} \cdot \text{ng}^{-1}$. En revanche, les LPS I et II de *P. testosteroni* 871204 sont plus réactifs que l'endotoxine de référence vis-à-vis du test LAL chromogénique avec respectivement $44 \text{ UE} \cdot \text{ng}^{-1}$ pour les LPS I et $23 \text{ UE} \cdot \text{ng}^{-1}$ pour les LPS II.

- Nous constatons également que les LPS I et II des deux souches que nous avons isolés des bains de dialyse présentent des différences de réactivité selon la technique d'extraction utilisée. Pour *P. cepacia* 871101 le LPS I est 4 fois plus réactif que le LPS II alors que pour *P. testosteroni* 871204 le rapport entre l'activité des LPS I et II est de 2.

Les LPS des souches de collection *P. cepacia* CIP 8024 et *P. testosteroni* CIP 5924 possèdent des activités LAL identiques, indépendamment de la technique utilisée pour leur extraction.

Les différences d'activité spécifique, observées pour les LPS I et II, provenant des deux souches isolées des bains de dialyse, sont peut-être liées à une variation des

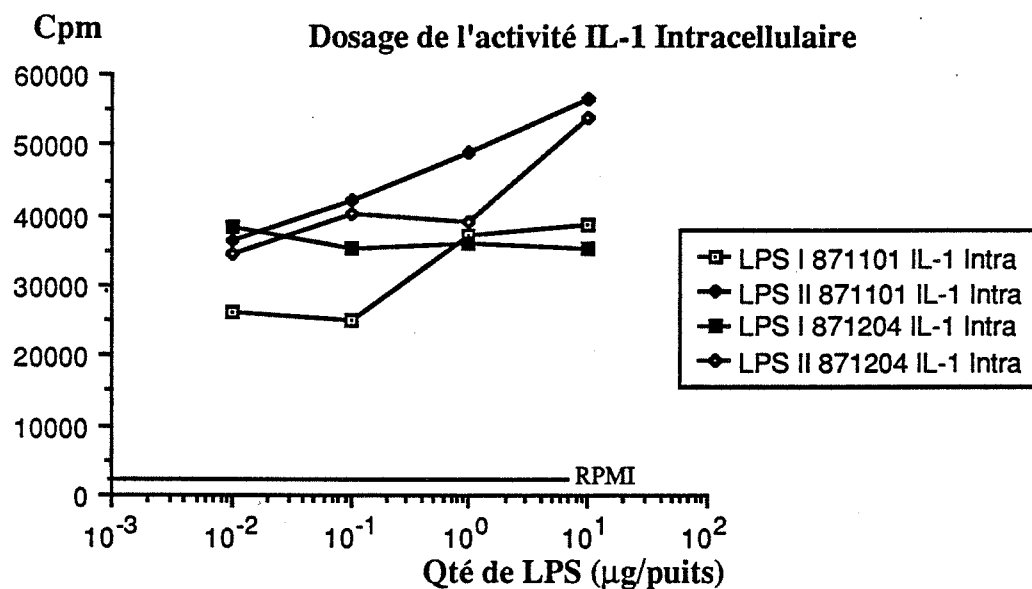
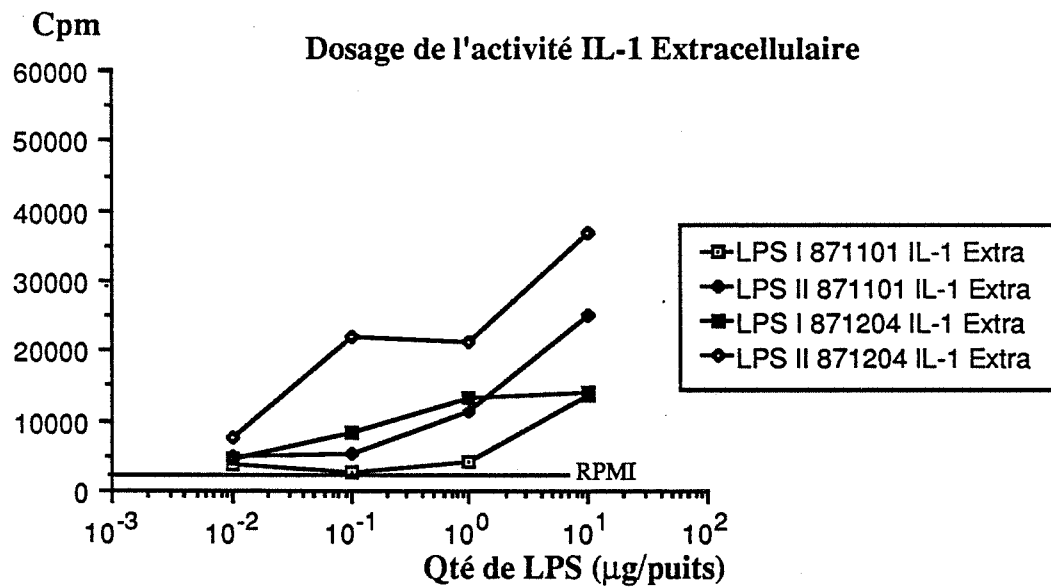


Figure 34 : Comparaison des activités IL-1 Extracellulaire et IL-1 Intracellulaire des LPS I et II de *P. testosteroni* 871204 et des LPS I et II de *P. cepacia* 871101.

proportions relatives des LPS de type R et S dans les deux extraits. En effet, le lipide A est la fraction biologiquement active dans le test LAL. Une plus grande proportion de LPS de forme (R) dans le LPS I peut donc, compte tenu de la sensibilité du test, expliquer la plus grande activité spécifique du LPS I par rapport au LPS II.

Cette plus grande proportion de LPS de forme (R) dans le LPS I peut être due également à une meilleure extraction des LPS les plus hydrophobes, par la technique de Galanos. En effet, le mélange de solvants utilisé pour cette extraction est plus favorable à la solubilisation des LPS de forme (R).

6-2 DOSAGE DE LA CAPACITÉ D'INDUCTION DE LA SYNTHÈSE D'INTERLEUKINE-1 (IL-1) PAR DES MONOCYTES HUMAINS *IN VITRO*.

Le test d'évaluation de la capacité d'induction de la synthèse d'interleukine-1 par des monocytes humains, réalisé *in vitro*, permet d'estimer de façon spécifique une action cellulaire des LPS. Ce test est assez proche des phénomènes biologiques qui peuvent survenir au cours des séances d'hémodialyse.

Il faut rappeler que cette activité biologique est évaluée à deux niveaux. On distingue en effet l'activité IL-1 intracellulaire de l'activité IL-1 extracellulaire. Cette dernière correspond à la quantité d'IL-1 excrétée par les monocytes dans le surnageant de culture.

L'activité IL-1 intracellulaire représente quant à elle, la quantité d'IL-1 présente au niveau de la membrane ou dans le cytoplasme du monocyte. Elle est libérée, afin d'être quantifiée, grâce aux trois cycles successifs de congélation-décongélation qui vont provoquer la lyse des monocytes.

Les résultats sont présentés sur la Figure 34 pour les LPS I et II de *P. cepacia* 871101 et de *P. testosteroni* 871204.

Nous pouvons en déduire les observations générales suivantes :

- L'activité IL-1 intracellulaire est toujours supérieure à l'activité IL-1 extracellulaire, quels que soient le LPS et la souche considérée. Ce résultat s'explique par le fait que la stimulation du monocyte par le LPS débute par l'induction de la synthèse d'IL-1 cytoplasmique et membranaire, puis, si le taux d'induction est suffisant, le monocyte excrète de l'IL-1 dans le milieu de culture.

- Le LPS II est plus inducteur que le LPS I, que ce soit au niveau intracellulaire ou extracellulaire.

Nous constatons donc que pour une même bactérie, l'activité la plus forte est obtenue pour l'IL-1 intracellulaire des LPS II ; la plus faible étant quant à elle observée pour l'IL-1 extracellulaire des LPS I.

Il existe, pour l'activité IL-1 extracellulaire, un seuil de stimulation qui se situe entre 0,1 µg et 1 µg pour les LPS (I et II) de *P. cepacia* 871101, et au voisinage de 0,01 µg pour les LPS de *P. testosteroni* 871204.

L'activité IL-1 intracellulaire est assez élevée pour la gamme de concentrations en LPS utilisée au cours de ce dosage. Son seuil de sensibilité est très faible, de l'ordre du picogramme (pg).

A l'exception de LPS I de *P. testosteroni* 871204 l'activité IL-1 intracellulaire évolue dans le même sens que la quantité de LPS présente dans le puits.

Ces résultats montrent une variation d'activité spécifique des LPS selon la souche bactérienne d'origine et selon la technique d'extraction utilisée. Ce phénomène doit pouvoir s'expliquer par une étude des relations structure-activité des LPS.

Nos études biochimiques ne font pas ressortir de différences significatives de la composition chimique des LPS I et II d'une même souche. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide ne permet pas non plus de déceler des différences de structure entre les LPS issus des deux techniques d'extraction utilisées.

En revanche, les deux souches de *Pseudomonas* testées ont, sur le plan biochimique, des LPS très différents. La comparaison de leur activité IL-1 montre que les LPS de *P. testosteroni* sont plus actifs que ceux de *P. cepacia* à l'exception de l'activité IL-1 intracellulaire des LPS II de *P. cepacia* 871101, qui est légèrement supérieure à celle des LPS II de *P. testosteroni* 871204.

HAEFFNER-CAVAILLON a montré que la teneur en KDO des LPS était corrélée à leur activité spécifique dans le test IL-1 [HAEFFNER-CAVAILLON et coll., 1989], sur la base des interactions, entre le LPS et le récepteur membranaire du monocyte, exposées Figure 17 [HAEFFNER-CAVAILLON et coll., 1986].

	<i>P. cepacia</i> 871101 LPS II		<i>P. testosteroni</i> 871204 LPS II	
	Rétentats	Eluats	Rétentats	Eluats
10 Kda	$2,8 \cdot 10^6$	156 ^(RV 45)	$8,54 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^4$ ^{4,52}
8 Kda	10^3	<1	10^4	1,1
5 Kda	10^2	2,4	13	1,6
3 Kda	10^2	<1	13	0,1
1 Kda	>1	<0,03	>1	<0,03

Les résultats sont exprimés en UE.ml⁻¹ (Unité d'Endotoxine par rapport au LPS de *E. coli* O111:B4).

Figure 35 a : Activité LAL des éluats obtenus après filtration en cascade des LPS II de *P. cepacia* 871101 et de *P. testosteroni* 871204.

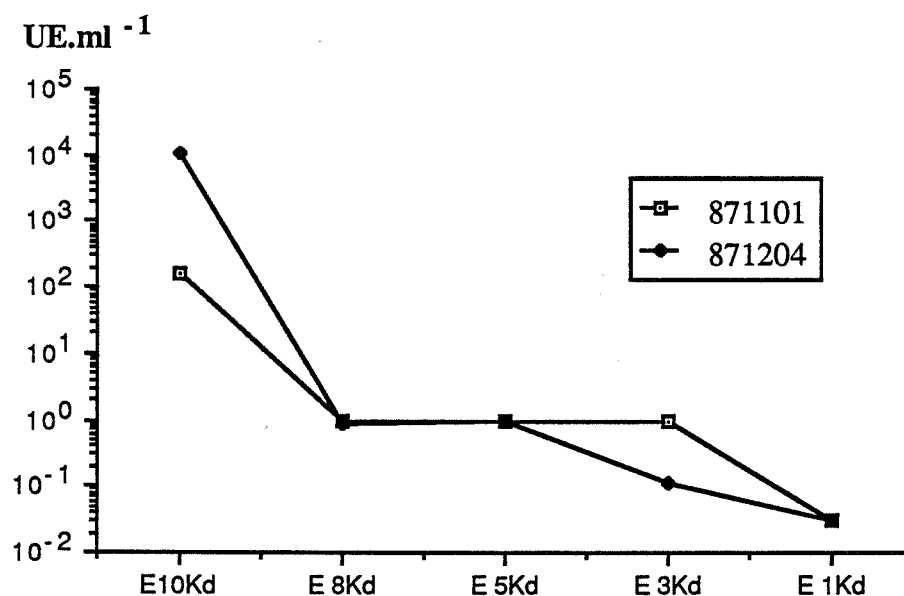


Figure 35 b : Comparaison de la filtration en cascade des LPS II de *P. cepacia* 871101 et *P. testosteroni* 871204. L'association des membranes de 10 Kda et 8 Kda permet une rétention d'endotoxine d'un facteur 10⁶.

Nous avons trouvé que le LPS II de *P. cepacia* 871101 qui contient 0,4 % de KDO a une activité IL-1 intracellulaire supérieure aux LPS de *P. testosteroni* 871204 qui possèdent 1,2 % de KDO.

Toutefois, la structure particulière des LPS de *P. cepacia* 871101 révélée par l'électrophorèse (DOC-PAGE) est peut-être à l'origine d'une plus forte activité IL-1, qui ne fait pas intervenir la teneur en KDO. Il faut rappeler que DOOLEY [DOOLEY et coll., 1985] a montré que cette structure particulière, observée chez des bactéries du genre *Aeromonas*, était associée à une augmentation de la virulence, qui pourrait peut-être s'exprimer par une activité biologique de type cellulaire telle que celle révélée par le test IL-1.

7 - ULTRAFILTRATION EN CASCADE DES LPS

Il nous a paru important d'étudier le transfert des LPS à travers des membranes de faible PMNL (seuil de coupure). En effet, des études réalisées au laboratoire et par l'équipe du Pr KAZATCHKINE [LAUDE-SHARP et coll., 1989] à l'aide des tests LAL et IL-1, semblent indiquer que les LPS sont capables de traverser les membranes d'hémodialyse. Nous avons donc cherché à définir le PMNL des membranes capables d'arrêter totalement les LPS.

Nous avons filtré les LPS II de *P. cepacia* 871101 et de *P. testosteroni* 871204 sur des membranes d'ultrafiltration de PMNL décroissantes (10 Kda, 8 Kda, 5 Kda, 3 Kda et 1 Kda) et évalué le passage des LPS à travers ces membranes grâce d'une part au test LAL et d'autre part à l'électrophorèse.

Les résultats des tests LAL effectués sur les éluats des différentes membranes sont reportés sur les Figures 35 a et 35 b.

Le LPS II de *P. cepacia* 871101 (10^6 UE.ml⁻¹) est pratiquement entièrement retenu sur la membrane de PMNL 10 Kda, l'éluat 10 Kda n'a plus qu'une activité de 156 UE.ml⁻¹, la rétention complète est assurée par la membrane de 8 Kda.

Le LPS II de *P. testosteroni* 871204 traverse plus facilement la membrane de 10 Kda l'activité LAL de l'éluat 10 Kda est encore très importante (10^4 UE.ml⁻¹). Néanmoins, la membrane de 8 Kda retient tous les LPS susceptibles de réagir dans le test LAL.

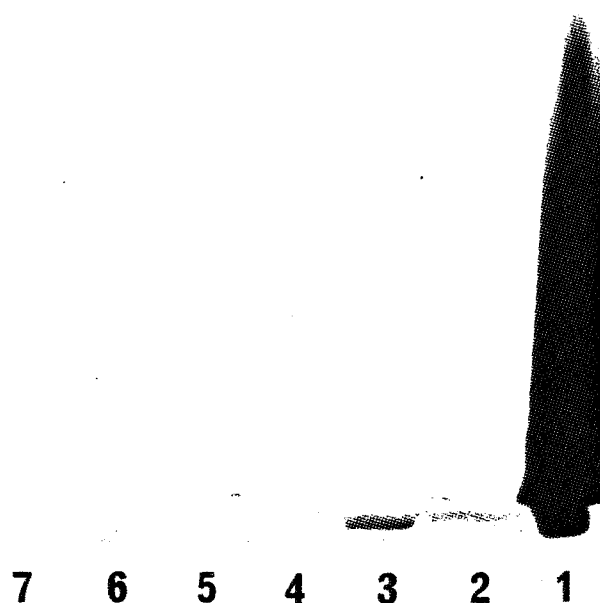


Figure 36 : Analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des fractions éluées après ultrafiltration en cascade des LPS II de *P. testosteroni* 871204

<u>Piste 1 :</u>	Rétentat 10 Kda
<u>Piste 2 :</u>	Eluat 10 Kda
<u>Piste 3 :</u>	Rétentat 8 Kda
<u>Piste 4 :</u>	Eluat 8 Kda
<u>Piste 5 :</u>	Eluat 5 Kda
<u>Piste 6 :</u>	Eluat 3 Kda
<u>Piste 7 :</u>	Eluat 1 Kda

Cette expérience ne nous permet pas de calculer le pouvoir de rétention des membranes car les LPS s'adsorbent sur celles-ci sans qu'il soit possible d'estimer la proportion de cette adsorption.

Les activités LAL obtenues pour les rétentats ne sont pas exploitables car la tête de la cellule d'ultrafiltration n'a pas été dépyrogénée entre chaque étape de la cascade et des LPS adsorbés sur celle-ci sont relargués tout au long de l'expérience.

Les résultats de l'analyse par électrophorèse (DOC-PAGE) des différentes fractions obtenues avec le LPS II de *P. testosteroni* 871204 sont indiqués sur la Figure 36. Ils montrent que la presque totalité des molécules de LPS sont retenues par la membrane de 10 Kda, ce qui conduit à une surcharge importante du gel, observée sur la Piste 1. Seule une faible partie des molécules de LPS est retrouvée dans l'éluat 10 Kda (Piste 2), mais celle-ci est totalement retenue par la membrane de 8 Kda, comme les Pistes 3 (Rétentat 8 Kda) et 4 (Eluat 8 Kda) le montrent. La Piste 4 ne présente en effet aucune bande décelable par la technique d'électrophorèse utilisée.

Les résultats obtenus en DOC-PAGE et par le test LAL concordent. Ils indiquent en effet qu'une membrane en polysulfone de PMNL 8 Kda est capable de retenir tous les LPS détectables par l'analyse en électrophorèse susceptibles de réagir avec le LAL.

8 - ÉVALUATION DE LA PERMÉABILITÉ DES MEMBRANES D'HÉMODIALYSE AUX LPS RADIOMARQUÉS.

Cette expérience a pour but de montrer la possibilité d'un transfert des LPS à travers les différents types de membranes d'hémodialyse. Nous avons testé trois types de membranes :

- la membrane Cuprophan® en cellulose régénérée,
- la membrane en polysulfone et
- la membrane AN69® qui est un copolymère d'acrylonitrile et de méthylsulfonate de sodium,

conditionnées sous la forme d'hémodialyseurs commerciaux, à fibres creuses, respectivement :

- Cuprophan® NT 1108 (Sorin Biomedica, Italie)
- polysulfone Hemoflow F60 (Fresenius, RFA)
- AN69® Filtral 10 (Hospal, France)

avec des surfaces membranaires développées respectives de 1,06 m² ; 1,25 m² et 0,85 m².

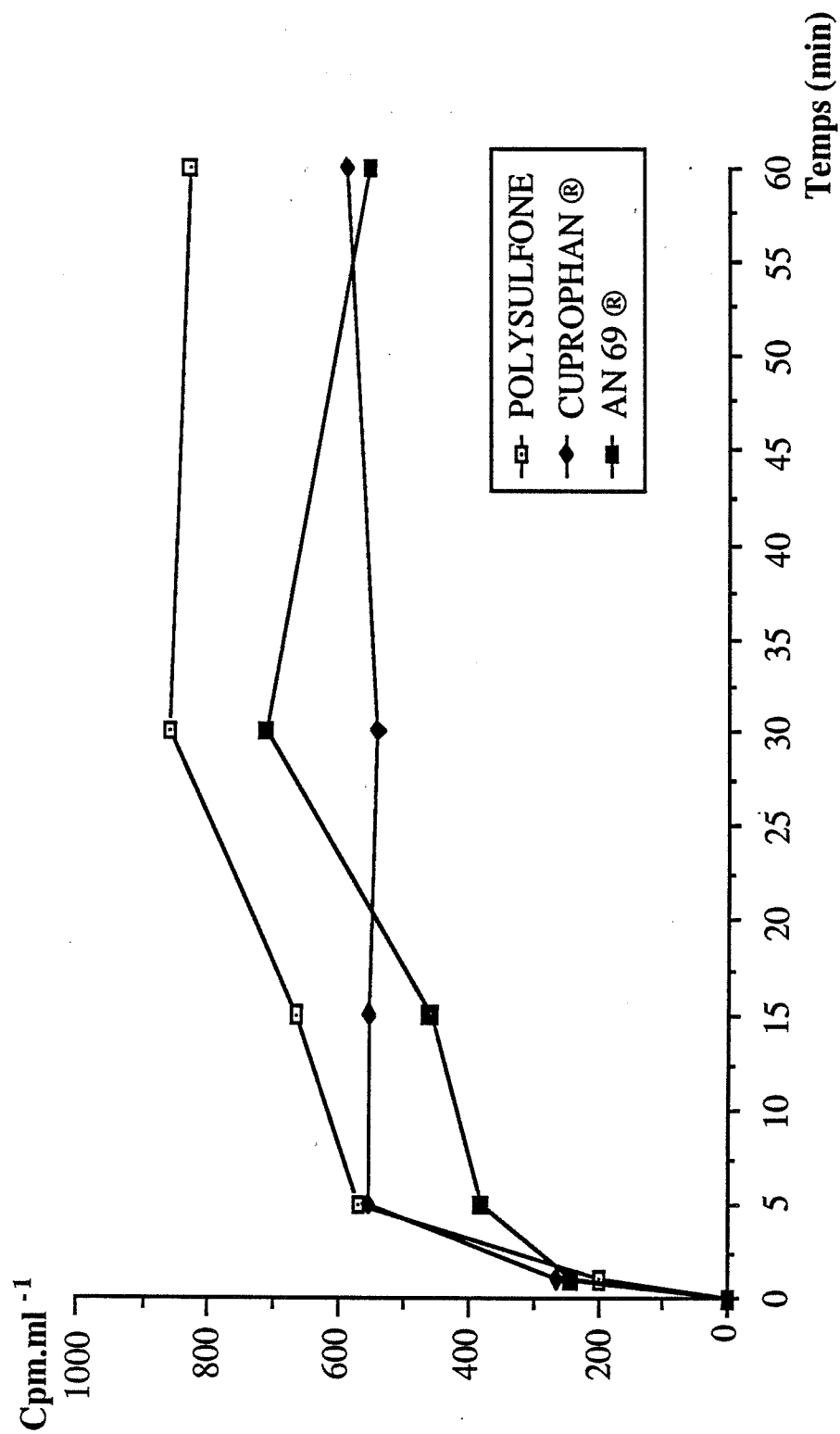


Figure 37 : Tests de perméabilité des membranes de dialyse aux ^3H -LPS de *P. testosteronei* 871204

Nous avons mesuré la radioactivité des échantillons prélevés simultanément dans le compartiment "Sang" et dans le compartiment "Bain" du circuit de dialyse *in vitro*.

Les résultats des échantillons prélevés dans le compartiment "Sang" sont indiqués Figure 37.

Ils traduisent un phénomène important, commun aux trois types de membranes testées, qui est le transfert de molécules de LPS radiomarqués à travers les membranes utilisées en hémodialyse et conditionnées dans des hémodialyseurs. De plus, ce passage se produit très rapidement, dans les toutes premières minutes de l'expérience. Ce résultat est important, car les chocs anaphylactoïdes observés lors des séances d'hémodialyse surviennent également au cours des premières minutes, dans la phase de branchement.

Ces résultats, obtenus en collaboration avec M. LAUDE-SHARP, sont les premiers qui permettent de mettre en évidence le passage de LPS à travers les membranes de dialyse. Ils montrent le passage de la molécule complète de LPS à travers les différentes membranes de dialyse testées.

Ils ne présentent pas l'ambiguïté d'interprétation rencontrée lors d'expériences similaires, réalisées avec des LPS non marqués, et au cours desquelles l'évaluation du transfert reposait sur des tests d'activité biologique [LAUDE-SHARP et coll., 1989]. Cette évaluation, réalisée à la fois par le test LAL et le test IL-1, ne permet pas d'affirmer néanmoins qu'il y a un passage de la molécule de LPS complète à travers la membrane, tout au plus, un transfert éventuel d'une fraction seulement de la molécule de LPS capable ou non de réagir avec un ou les deux tests d'activités biologiques utilisés.

CONCLUSION
CONCLUSION
CONCLUSION

Notre étude de la flore microbienne présente dans les différents liquides de dialyse montre la prédominance de bactéries à Gram négatif dont la paroi renferme des Lipopolysaccharides (LPS). Ces bactéries appartiennent essentiellement au genre *Pseudomonas*. L'étude de leur répartition selon l'origine des prélèvements indique que les deux espèces majoritaires *cepacia* et *testosteroni* sont également les plus ubiquitaires.

La caractérisation biochimique des LPS de deux souches appartenant à ces deux espèces nous a permis de dégager les points suivants :

- L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide (DOC-PAGE) ne montre pas de différence significative dans le comportement des LPS extraits selon les deux techniques les plus courantes : les LPS I par la technique P.C.P [GALANOS et coll., 1969], et les LPS II par la technique au phénol aqueux [WESTPHAL et coll., 1952]. Les deux souches présentent néanmoins des profils électrophorétiques très différents. Les LPS de *P. cepacia* 871101 possèdent, outre des LPS de forme R, une homogénéité de structure des LPS de forme S qui semble liée à l'existence d'une protéine cristalline au sein de la paroi [DOOLEY et coll., 1985].

Les LPS de *P. testosteroni* sont composés de LPS de forme R et de LPS de forme S qui possèdent des chaînes polysaccharidiques constituées d'un nombre réduit de sous-unités O-spécifiques.

- L'analyse de la composition biochimique met en évidence une homogénéité entre les LPS I et les LPS II. Nos résultats confirment certaines données de la littérature concernant les LPS de *Pseudomonas* [WILKINSON et coll., 1973, KROPINSKI et coll., 1985] :

- la teneur en KDO est très variable selon les espèces et selon les souches au sein d'une même espèce ce qui semble indiquer que la partie "core" n'est pas aussi constante au sein du genre *Pseudomonas* que pour les différents genres bactériens qui composent la famille des Entérobactéries;

- la quantité de glucosamine varie également selon l'espèce et selon la souche, ce qui traduit la présence d'oses aminés au niveau de la chaîne polysaccharidique de certains LPS susceptibles d'interférer dans le dosage;

- la composition en oses neutres des LPS de *P. cepacia* 871101 rejoint les données de la littérature. En revanche, la souche 871204 de *P. testosteroni* présente deux particularités : une absence totale de rhamnose et la présence de fucose, sucre inhabituel des LPS de *Pseudomonas*;

- nous avons trouvé la présence d'acide gras β -hydroxylé de type β -hydroxylaurique ($C_{12:0}$ OH(3)), différent de celui retrouvé dans les LPS des Entérobactéries.

Les études d'activités biologiques effectuées avec le test d'induction de la synthèse d'IL-1 font apparaître des activités spécifiques différentes selon les LPS et selon les souches. Cependant, aucune corrélation ne peut être effectuée entre ces deux tests car ils mettent en jeu des fonctions biologiques différentes : le test LAL fait appel à une fonction de type moléculaire alors que le test IL-1 fait appel à une fonction de type cellulaire.

Les résultats de l'étude consacrée au passage des LPS à travers différents types de membranes montrent que pour les membranes d'ultrafiltration, le seuil de coupure nécessaire à la rétention de tout LPS susceptible de réagir avec le LAL et détectable en électrophorèse est de 8 Kda.

Ils prouvent également à l'aide de LPS radioactifs (3H -LPS) que le transfert des LPS à travers trois membranes de dialyse du commerce survient dès les premières minutes de la simulation d'une séance de dialyse. Ceci indique que l'hypothèse impliquant les LPS comme l'origine des réactions anaphylactoïdes observées lors de certaines séances d'hémodialyse est confortée par la mise en évidence du passage de ces LPS à travers les membranes des hémodialyseurs du commerce.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS, G.A., QUADLING, C., PERRY, M.B., 1967
D-glycero-D-manno-heptose as a component of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria
Can. J. Microbiol., 13, 1605-1613
- AREND, W.P., MASSONI, R.J., 1986.
Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes.
Clin. Exp. Immunol., 64, 656-664
- BANG, F.B., 1956
A bacterial disease of *Limulus polyphemus*
Bull. Johns Hopkins Hosp., 98, 325
- BARROW, R., WHEAT, R.W., 1972
In Cellular Antigens, 22-30
Nowotny, A. ed., Springer, New-York
- BAURMEISTER, U. VIENKEN, J., HARDING, G., KLEIN, E., 1988
Dialysate quality and backfiltration: Key issue in the use of Low and High flux membranes.
International Course on Therapeutic Advances in Nephrology, Mexico December 14-18
- BERNICK, J.J., PORT, F.K., FAVERO, M.S., BROWN, D.G., 1979.
Bacterial and endotoxin permeability of hemodialysis membranes.
Kidney Int., 16, 491-496
- BETZ, M., 1988
Biocompatibilité et membranes de dialyse
Colloque Franco-Allemand ERAI, LYON, 3-4 mars
- BINGEL, M., LONNEMANN, G., KOCH, K.M., DINARELLO, C.A., SHALDON, S., 1988.
Plasma interleukin-1 activity during hemodialysis: the influence of dialysis membranes.
Nephron, 50, 273-276
- BITTER, T., MUIR, H.M., 1962
A modified uronic acid carbazole reaction
Anal. Biochem., 4, 330-334
- BOIVIN, A., MESROBEANU, L., 1933
Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les substances phosphorées au cours de l'autolyse bactérienne.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 112, 611-615
- BOMMER, J., RITZ, E., 1987a.
Water quality : a neglected problem in hemodialysis.
Nephron, 46, 1-6
- BOMMER, J., BECKER, P., URBASCHEK, R., RITZ, E., URBASCHEK, B., 1987b.
No evidence for endotoxin transfer across high flux polysulfone membranes.
Clin. Nephrol., 27(6), 278-282
- BORDET, C., BRUNETEAU, M., MICHEL, G., 1977
Lipopolysaccharides d'une souche à virulence atténuée de *Yersinia pestis*
Eur. J. Biochem., 79, 443-449

- BOUSQUET, J., MAURICE, F., RIVORY, J.P., SKASSA-BROCIEK, W., FLORENCE, P., CHOUZENOUX, R., MION, C., MICHEL, F.B., 1988
Allergy in long term hemodialysis: II. allergic and atopic patterns of a population of patients undergoing long term hemodialysis
J. Allergy Clin. Immunol., 81(3), 205-210
- BRADE, H., BRADE, L., RIETSCHEL, E.T., 1988
Structure-activity relationships of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins): current and future aspects
Zbl. Bakt. Hyg. A , 268, 151-179
- BROWN, F., NEAL, D.J., WILKINSON, S.G., 1977
Presence of 3-O-methyl-L-xylose in the lipopolysaccharide of *Pseudomonas maltophilia* NCTC 10257
Biochem. J., 163, 173-175
- CAROFF, M., LEBBAR, S., SZABO, L., 1987
Do endotoxins devoid of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid exist
Biochem. Biophys. Res. Commun., 143(3) 845-847
- CENTANNI, E., 1894
Untersuchungen über das infektiönsfieber-das fiebergift der bakterien
Dtsch. Med. Wochenschr., 20, 148
- CHESTER, I.R., GRAY, G.W., WILKINSON, S.G., 1972
Further studies of the chemical composition of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*
Biochem. J. , 126, 395-407
- CHESTER, I.R., MEADOW, P.M., 1973
The relationship between the O-antigenic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of *Pseudomonas aeruginosa* of different O-serotypes
J. Gen. Microbiol. , 78, 305-318
- CHESTER, I.R., MEADOW, P.M., 1975
Heterogeneity of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*
Eur. J. Biochem., 58, 273-282
- DI FABIO, J.L., PERRY, M.B., BUNDLE, D.R., 1987
Analysis of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas maltophilia* 555
Biochem. Cell. Biol. , 65, 968-977
- DINARELLO, C.A., 1988
Interleukin-1
Digest. Dis. Sci. , 33(3), 25s-35s
- DMITRIEV, B.A., KNIREL, Y.A., KOCHAROVA, N.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1980
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. the structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O-serogroup 7 (Lanyi) lipopolysaccharide
Eur. J. Biochem. , 106, 643-651
- DMITRIEV, B.A., KOCHAROVA, N.A., KNIREL, Y.A., SHASHKOV, A.S., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1982
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. the structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O:6(Lanyi) lipopolysaccharide
Eur. J. Biochem. , 125, 229-237

- DOOLEY, J.S.G., LALLIER, R., SHAW, D.H., TRUST, T.J., 1985
Electrophoretic and immunochemical analysis of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*
J. Bacteriol., 164(1), 263-269
- DREWRY, D.T., SYMES, K.C., GRAY, G.W., WILKINSON, S.G., 1975
Studies of polysaccharide fractions from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 1999
Biochem. J. , 149, 93-106
- DRIGUES, P., DEMERY-LAFFORGUE, D., TRIGALET, A., DUPIN, P., SAMAIN, D., ASSELINEAU, J., 1985
Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharides from a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants
J. Bacteriol. , 162(2), 504-509
- DU MOULIN, G.C., COLEMAN, E.C., HEDLEY-WHYTE, J., 1987
Bacterial colonization and endotoxin content of a new renal dialysis water system composed of abs
Appl. Environ. Microbiol. , 53(6), 1322-1326
- EBBEN, J.P., HIRSCH, D.N., LUEHMANN, D.A., COLLINS, A.J., KESHAVIAH, P.R., 1987
Microbiologic contamination of liquid bicarbonate concentrate for hemodialysis
Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs , 33, 269-273
- FENSOM, A.H., GRAY, G.W., 1969
The chemical composition of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*
Biochem. J. , 114, 185-196
- FENSOM, A.H., MEADOW, M., 1970
Evidence for two regions in the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* 8602
FEBS Lett. , 9(2), 81-84
- FOMSGAARD, A., 1988
Comparative immunochemistry of lipopolysaccharides from typable and polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis
J. Clin. Microbiol., 26(5), 821-826
- FORET, M., KUENTZ, F., HACHACHE, T., CHRISTOLLET, M., MILONGO, R., MEFTAH, H., DECHELETTE, E., CORDONNIER, D.J., 1985
Hypersensitivity reactions during hemodialysis in France
Proc. Edta-era , 22, 181-186
- FRIBERGER, P.; 1982
A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate.
In Endotoxins and their detection with the *Limulus* Amebocyte Lysate test
Progr. Clin. Biol. Res., 93, 195
(Eds Watson S.W., Levin, J. and Novitsky T.J. Alan R. Liss Inc N.Y.)
- GALANOS, C., LUDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1969
A new method for the extraction of R lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. , 9, 245-249

- GUYOT, C., RENOULT, E., ROZE, J.C., 1984
Anaphylaxie en hémodialyse pédiatrique
Abstract Symposium on Biocompatibility, Grenoble
- HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAVAILLON, J-M., 1986
Involvement of the LPS receptor in the induction of interleukin-1 in human monocytes stimulated with endotoxins
An. Inst. Pasteur Immunol. , 7, 473-477
- HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAROFF, M., CAVAILLON, J-M., 1989
Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO)
Molec. Immunol. , 26(5), 485-494
- HAMILTON, R.G., ADKINSON Jr, N.F., 1984
Mechanisms of acute allergic reactions
Artif. Organs, 8(3), 311-317
- HANESSIAN, S.; REGAN, W.; WATSON, D.; HASKELL, T.H., 1971
Antigenic components of a new heptavalent *Pseudomonas* Vaccine
Nature, 229, 209-210
- HITCHCOCK, P.J., BROWN, T., 1983
Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels.
J. Bacteriol. , 166(3), 699-705
- HOMMA, J.Y., 1982
Designation of the thirteen o-group antigens of *Pseudomonas aeruginosa*; an amendment for the tentative proposal in 1976
Japan J. Exp. Med. , 52(6), 317-320
- HORTON, D.; RILEY, D.A., 1981
The absence of triphosphate or metaphosphate residues from lipopolysaccharides of seven Fisher immunotypes of *Pseudomonas aeruginosa*
BJ Lett., 199, 835-836
- IKEDA, K., EGAMI, F., 1973
Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to pyocin R receptor activity
J. Gen. Appl. Microbiol. , 19, 115-128
- IWANAGA, S., MORITA, T., HARADA, T., NAKAMURA, S., NIWA, M., TAKADA, K., KIMURA, T., SAKAKIBARA, S., 1978
Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme
Haemostasis, 7, 183-188
- JANS, H., BRETlau, P., NIELSEN, B., 1978
Bacterial contamination of dialysers: clinical, bacteriological and scanning electron-microscopic evaluation of different dialysate mixing systems
Nephron , 20, 10-17
- JENKINS, S.R., LIN, F.Y.C., LIN, R.S., ISRAEL, E., PETERSEN, N.J., 1987
Pyrogenic reactions and *Pseudomonas* bacteremias in a hemodialysis center
Dialys. Transplant. , 16(4), 192-197

- KARKHANIS, Y.D., ZELTNER, J.Y., JACKSON, J.J., CARLO, D.J., 1978
A new and improved microassay to determine 2-Keto-3-deoxyoctonate in Lipopolysaccharide of Gram negative bacteria
Anal. Biochem., 85, 595-601
- KAYA, S., ARAKI, Y., ITO, E., 1989a
The structure of the O-polysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID 1009 (ATCC 27585)
J. Biochem. , 105, 35-38
- KAYA, S., ARAKI, Y., ITO, E., 1989b
The structure of the O-specific chain of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID 1012 (ATCC 27588)
J. Biochem. , 105, 29-34
- KAZATCHKINE, M.D., CARRENO, M.P., 1988
Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces
Biomaterials , 9, 30-35
- KLINKMAN, H., FALKENHAGEN, D., SMOLLICH, B.P., 1985
Investigation of the permeability of highly permeable polysulfone membranes for pyrogens
Contr. Nephrol. , 46, 174-183
- KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKI, E.S., MASHILOVA, G.M., 1982a
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O:3a,b and O:3 a,d lipopolysaccharides
Eur J. Biochem. , 128, 81-90
- KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1982b
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O:2(Lanyi) lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. , 125, 221-227
- KNIREL, Y.A., SKVORTSOV, I.M., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1985a
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O11(Lanyi) lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. , 150, 551-557
- KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1985b
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific of lipopolysaccharide of *P. aeruginosa* serogroup O4(Lanyi) and related serotype O6 (Habs) and immunotype 1 (Fisher)
Eur. J. Biochem. , 150, 541-550
- KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., 1986
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of *P. aeruginosa* O10(lanyi) lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. , 157, 129-138

- KNIREL, Y.A., VINOGRADOV, E.V., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., **1987a**
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*: The structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* O13 (Lanyi)
Eur. J. Biochem. , 163, 627-637
- KNIREL, Y.A., KOCHAROVA, N.A., SHASHKOV, A.S., DMITRIEV, B.A., KOCHETKOV, N.K., STANISLAVSKY, E.S., MASHILOVA, G.M., **1987b**
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*: The structure of the O-specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* O5 (Lanyi) and immunotype 6 (Fisher)
Eur. J. Biochem. , 163, 639-652
- KNIREL, Y.A., KACHAROVA, N.A., SHASHKOV, A.S., KOCHETKOV, N.K., KHOLODKOVA, E.V., STANISLAVSKY, E.S., **1987c**
Somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. The structure of O-specific polysaccharide chains of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* II (Sandvik) and (Im-1, Veder-evans)
Eur. J. Biochem. , 166, 189-197
- KOMURO, T., GALANOS, C., **1988**
Analysis of *Salmonella* lipopolysaccharides by sodium deoxycholate-polyacrylamide gel electrophoresis
J. Chromatogr., 450, 595-601
- KOVAL, S.F.; MEADOW, P.M., **1975**
The relationship between aminosugars in the lipopolysaccharide, serotype and aeruginocin sensitivity in strains of *Pseudomonas aeruginosa*
J. Gen. Microbiol., 91, 437-440
- KROPINSKI, A.M., JEWELL, B., KUZIO, J., MILAZZO, F., BERRY, D., **1985**
Structure and function of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide.
Antibiot. Chemother. , 36, 58-73
- LACHMAN, L.B., **1983**
Interleukin-1 release from LPS-stimulated mononuclear phagocytes.
In Beneficial effects of endotoxin (Ed by A. Nowotny) Plenum Press New-York USA
- LAEMMLI, U.K., **1970**
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, 227, 680-685
- LAM, M.C.Y., MC GROARTY, E.J., KROPINSKI, A.M., MC DONALD, L.A., PEDERSEN, S.S., HOIBY, N., LAM, J.S., **1989**
Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*
J. Clin. Microbiol. , 27(5), 962-967
- LAUDE-SHARP, M., HAEFFNER-CAVAILLON, N., CAROFF, M., LANTREIBECQ, F., PUSINERI, C., KAZATCHKINE, M. **1989**
Dissociation between the interleukin-1-inducing capacity and *Limulus* reactivity of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria
Cell, Immunol. (soumis pour publication)

- LEBBAR, S., CAVAILLON, J-M, CAROFF, M., LEDUR, A., BRADE, H., SARFATI, R., HAEFFNER-CAVAILLON, N., 1986
Molecular requirement for interleukin-1 induction by lipopolysaccharide-stimulated monocytes : involvement for the heptosyl-2-keto-3-deoxyoctulosonate region
Eur. J. Immun., 16, 87-91
- LE MINOR, L., VÉRON, M., 1982
Bactériologie médicale
Flammarion Médecine Sciences
- LEVIN, J.; BANG, F.B., 1964a
The role of endotoxin in extracellular coagulation of *Limulus* blood
Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 265
- LEVIN, J.; BANG, F.B., 1964b
A description of cellular coagulation in the *Limulus*
Bull. Johns Hopkins Hosp., 115, 337
- LEVIN, J.; BANG, F.B., 1968
Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin
Thromb. Diath. Haemorrh., 19, 186
- LONNEMANN, G., BINGEL, M., KOCH, K.M., SHALDON, S., DINARELLO, C.A., 1987
Plasma interleukin-1 activity in humans undergoing hemodialysis with regenerated cellulosic membranes
Lymphokine Res. , 6(2), 63-70
- LOPPNOW, H., BRADE, H., DURRBAUM, I., DINARELLO, C.A., KUSUMOTO, S., RIETSCHER, E.T., FLAD, H-D., 1989
IL-1 induction capacity of defined lipopolysaccharide partial structures
J. Immunol. , 142(9), 3229-3238
- LOWRY O.H., ROBERTS, N.R., LENIER, K.Y., WU, M.L., FARR, A.L., 1954
The quantitative histochemistry of brain I : Chemical methods.
J. Biol. Chem., 207, 1-17
- LUGER, A., KOVARIK, J., STUMVOLL, H-K., URBANSKA, A., LUGER, T.A., 1987
Blood- membrane interaction in hemodialysis leads to increased cytokine production
Kidney Int., 32, 84-88
- MAN, N.K., CIANCIONI, C., FAIVRE, J.M., DIAB, N., LONDON, G., MARET, J., WAMBERGUE, F.P., 1988
Dialysis-associated adverse reactions with high-flux membranes and microbial contamination of liquid bicarbonate concentrate
Contr. Nephrol. , 62, 24-34
- MANNIELLO, J.M., HEYMANN, H., ADAIR, F.W., 1979
Isolation of atypical lipopolysaccharides from purified cell walls of *Pseudomonas cepacia*
J. Gen. Microbiol. , 112, 397-400
- MLYNARCIK, D., MUSZYNSKI, Z., 1974
Immunochemical and toxic properties of the lipopolysaccharides from highly and low virulent *Pseudomonas aeruginosa* strains
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. , 18(4), 425-428

- MONTAGNAC, R., SCHILLINGER, F., MILCENT, T., CROIX, J.C., 1988
Réactions d'hypersensibilité en cours d'hémodialyse. Rôles de la haute perméabilité, de la rétrofiltration et de la contamination bactérienne du dialysat
Néphrologie, 9, 29-32
- NAOI, M., EGAMI, F., HAMAMURA, N., HOMMA, J.Y., 1958
Das toxische lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa*
Biochem. Zeit., 330, 421-427
- NEWTON, R.C., 1986
Human monocyte production of interleukin-1 : parameters of the induction of interleukin-1 secretion by lipopolysaccharides
J. Leuk. Biol., 39, 299-311
- NOSÉ, Y., 1984
Hypersensitivity in Hemodialysis : only the Tip of the Iceberg
Artif. Organs, 8(3), 268-269
- OKUDA, S., SUZUKI, N., 1983
2,3-diamino-2,3-dideoxy-d-glucofurano-6,3-lactam from the hydrolysate of *Pseudomonas aeruginosa* P14 lipopolysaccharide
Biochem. J., 215, 597-604
- OSBORN, M.J., 1963
Studies on the Gram-negative cell wall. I. Evidence for the role of 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 50, 499-506
- PALLERONI, N.J., 1984
Pseudomonas
In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 141-199
Krieg, N.R. Baltimore: Williams et Wilkins
- PALMER, J.W., GERLOUGH, T.D., 1940
A simple method for preparing antigenic substances from the typhoid bacillus
Science, 92, 155-156
- PERRY, M.B.; DAOUST, V., 1974
The methyl ether of 2-amino-2,6-dideoxyglucopyranose (Quinovosamine)
Can. J. Chem., 52, 2425-2429
- PETERSON, A.A., MC GROARTY, E.J., 1985
High molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., 162(2), 738-745
- PFEIFFER, R., 1892
Untersuchungen über das choleragift
Z. Hyg. Infektionskrankh., 11, 393-412
- PIER, G.B., MARKHAM, R.B., EARDLEY, D., 1981
Correlation of the biologic responses of C3H/HeJ mice to endotoxin with the chemical and structural properties of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*
J. Immunol., 127(1), 184-191

- RAIJ, L., SHAPIRO, F.L., MICHAEL, A.F., 1973
Endotoxemia in febrile reactions during hemodialysis
Kidney Int., 4, 57-60
- RIETSCHEL, E. TH., GOTTERT, H., LÜDERITZ, O., WESTPHAL, O., 1972
Nature and linkages of the fatty acids present in the Lipid-A component of *Salmonella* Lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem., 28, 166-173
- RIETSCHEL, E. TH., BRADE, L., SCHADE, U., SEYDEL, U., ZÄHRINGER, U., KUSUMOTO, S., BRADE, H., 1988
Bacterial endotoxins : properties and structure of biologically active domains
in : Surface structures of microorganisms and their interactions with the mamalian host.
Ed. by Schrinner, E., VCH Weinheim (RFA)
- RONALD, L.W., KLEIN, E., 1984
Hypersensitivity in Hemodialysis
Artif. Organs, 8(3), 270-272
- ROSNER, M.R., KHORANA, H.G., SATTERTHWAIT, A.C., 1979
The structure of lipopolysaccharide from a heptose-less mutant of *Escherichia coli* K-12
J. Biol. Chem., 254(13), 5918-5925
- ROWE, S.N., MEADOW, P.M., 1983
Structure of the core oligosaccharide from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* PAC1R and its defective mutants
Eur. J. Biochem., 132, 329-337
- SAMSON WRIGHT, 1973
Physiologie appliquée à la Médecine
Ed Flammarion Médecine-Sciences, 12^{ème} édition, 223
- SAWARDEKER, J.S., SLONEKER, J.H., JEANES, A., 1965
Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography
Anal. Chem., 37(12), 1602-1604
- SHIELDS, R., BURNETT, W., 1960
Determination of protein bound carbohydrate in serum by a modified anthrone method.
Anal. Chem., 32, 885-886
- SOLUM, N.O., 1970
Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells
Thromb. Diath. Haemorrh., 23, 170
- SOLUM, N.O., 1973
The coagulogen of *Limulus polyphemus* hemocytes. A comparison of the clotted and non clotted forms of the molecule
Thomb. Res., 2, 55
- STROMINGER, J.L., PARK, J.F., THOMSON, R.E., 1959
Composition of the cell wall of *Staphylococcus aureus* . Its relation to the mechanism of action of Penicillin.
J. Biol. Chem., 234, 3263-3269

SUZUKI, N., 1969

Isolation of DL-fucosamine from *Pseudomonas aeruginosa* N10
Biochim. Biophys. Acta , 177, 371-373

SUZUKI, N., 1974

Correlation between pyocin-sensitivity and 2-amino sugar composition of *Pseudomonas aeruginosa*
FEBS Lett., 48, 301-305

TAHARA, Y., WILKINSON, S.G., 1983

The lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 8505. Structure of the O-specific polysaccharide
Eur. J. Biochem. , 134, 299-304

TAI, J.Y.; LIU, T.Y., 1977

Studies on *Limulus* lysate. Isolation of pro-clotting enzyme
J. Biol. Chem., 252, 2178

TANAMOTO, K., ABE, C., HOMMA, Y., KOJIMA, Y., 1979

Regions of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* essential for antitumor and interferon inducing activities
Eur. J. Biochem, 97, 623-629

TSAI, C-M, FRASCH, C.E, 1982

A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. , 119, 115-119

TUCKER, S.B., PIERRE, R.V., JORDON, R.E., 1977

Rapid indentification of monocytes in a mixed mononuclear preparation
J. Immun. Meth., 14, 267-269

WAMBERGUE, F., BENE, B., BENCHETRIT, C., CABRERA, N., 1984

Manifestations allergiques precoces liées a la contamination bactérienne du dialysat
Abstract Symposium on Biocompatibility, Grenoble

WATSON, J., RIBLET, R., 1975

Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice II. A gene that influences a membrane component involved in the activation of bone marrow-derived lymphocytes by lipopolysaccharides
J. Immunol. , 114(5), 1462-1468

WEINREICH, T., 1988

Formation d'Interleukine au cours de l'hémodialyse. Colloque Franco-Allemand ERAI, LYON, 3-4 mars

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., BISTER, F., 1952

Über die extraktion von bakterien mit phenol/wasser
Z. Naturforschg. , 7b, 148-155

WILKINSON, S.G., 1970

Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to EDTA acid
J. Bacteriol. , 104(3), 1035-1044

WILKINSON, S.G., BELL, M.E., 1971

The phosphoglucolipid from *Pseudomonas diminuta*
Biochim. Biophys. Acta , 248, 293-299

- WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L., LIGHTFOOT, G.A., 1973
Cell wall, lipids, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas* species
Eur. J. Biochem. , 33, 158-174
- WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L., 1975
Studies of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*
Eur. J. Biochem. , 52, 331-343
- WILKINSON, S.G., 1977a
Composition and structure of bacterial lipopolysaccharides
In Surface Carbohydrates of The Prokaryotic Cell, Ed. Sutherland, I.; Academic Press, New-York
- WILKINSON, S.G., 1977b
Amino components of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 8505; presence of 2,4 diamino-2,4,6-trideoxy-d-glucose
Biochem. J. , 161, 103-109
- WILKINSON, S.G., 1981a
Isolation of d-threo-pent-2-ulose from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas diminuta* NCTC 8545
Carbohydr. Res. , 98, 247-252
- WILKINSON, S.G., 1981b
³¹P Nmr evidence for the presence of triphosphate residues in lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*
BJ Lett., 199, 833-834
- WILKINSON, S.G., GALBRAITH, L., ANDERTON, W.J., 1983
Lipopolysaccharide from *Pseudomonas maltophilia*: composition of the lipopolysaccharide and the structure of the side-chain polysaccharide from strain NCIB 9204
Carbohydr. Res. , 112, 241-252
- YOKOTA, S., KAYA, S., KAWAMURA, T., ARAKI, Y., ITO, E., 1986
The structure of O-specific chains of lipopolysaccharide from *P. aeruginosa* IID 1008 (ATCC 27584)
J. Biochem. , 99, 1551-1561
- YOKOTA, S., KAYA, S., SAWADA, S., KAWAMURA, T., ARAKI, Y., ITO, E., 1987
Characterization of a polysaccharide component of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID 10008 (ATCC 27584) as D-rhamnan
Eur. J. Biochem. , 167, 203-209
- YOKOTA, S., KAYA, S., ARAKI, Y., ITO, E., 1988
Structure of the O-polysaccharide chains of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IID (ATCC 27577)
J. Biochem. , 104, 671-678
- YOUNG, N.S., LEVIN, J., PRENDERGAST, R.A., 1972
An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation
J. Clin. Invest. , 51, 1790-1797

